



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA
ENDONUCLEASA ESPECÍFICA DE ESTRUCTURA
Mus81-Mms4/EME1**

**María Gallo Fernández
Madrid, 2017**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA
ENDONUCLEASA ESPECÍFICA DE ESTRUCTURA
Mus81-Mms4/EME1**

Memoria presentada por la Licenciada en Biología
María Gallo Fernández
para optar al grado de Doctora en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM)
bajo la dirección del Doctor José Antonio Tercero Orduña

Para la realización de esta tesis doctoral se ha contado con una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyectos BFU2010-16989/BMC y BFU2013-43766-P).

SUMMARY

The maintenance of genome stability during eukaryotic chromosome replication and the fidelity of DNA synthesis are essential for cell survival and to prevent pathological conditions that in metazoans could lead to cancer and other diseases. Together with many other proteins, different specific endonucleases contribute to genomic stability thanks to their ability to cleave DNA secondary structures that arise during replication-associated repair processes or during replication restart after fork blocks. In this PhD thesis, we focused our work on the study of one of these endonucleases: the conserved heterodimeric complex Mus81-Mms4/EME1. This endonuclease is composed of a catalytic subunit, Mus81/MUS81, and a non-catalytic subunit, EME1/Mms4 (EME1/Eme1 in mammals, *Schizosaccharomyces pombe* and plants, Mms4 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila*), both of which are required for the activity of the complex.

In this PhD thesis, using the budding yeast *S. cerevisiae* as a model organism, we have studied the function and regulation of Mus81-Mms4 in proliferating cells. We have found that this endonuclease is strictly regulated during the mitotic cell cycle by Cdc28 (CDK)- and Cdc5 (PLK)- dependent phosphorylation of the non-catalytic subunit Mms4. The phosphorylation of this subunit occurs only after bulk DNA synthesis and before chromosome segregation, and is absolutely necessary for the endonuclease function of the Mus81-Mms4 complex. Mus81-Mms4 regulation determines its activity through the cell cycle, so that it is low during G1 and S phases and high at the G2/M transition and during mitosis. Moreover, despite being required for dealing with DNA lesions that hinder replication, Mus81-Mms4 activation is not induced by the presence of DNA damage at replication forks. Full Mus81-Mms4 activity is only acquired when cells finish S-phase and the endonuclease executes its function after the bulk of genome replication is completed. The mode of regulation of Mus81-Mms4 restricts its activity to a short period of the cell cycle, thus preventing its function during chromosome replication and the potential negative consequences for genome stability derived from its nucleolytic action. Yet, the controlled Mus81-Mms4 activity provides a fail-safe mechanism that guarantees the resolution of DNA intermediates that may remain after replication and require processing before chromosome segregation.

ÍNDICE

ABREVIATURAS 1

INTRODUCCIÓN 5

1. DAÑO EN EL DNA Y ESTABILIDAD GENÓMICA 7

2. TIPOS DE DAÑO EN EL DNA 8

3. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA 10

3.1. Reversión directa del daño en el DNA 10

3.2. Reparación de apareamientos erróneos (MMR) 11

3.3. Reparación por escisión de bases (BER) 11

3.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER) 12

3.5. Reparación de roturas de doble cadena (DSBR) 13

4. MECANISMOS DE TOLERANCIA AL DAÑO EN EL DNA 17

5. ENDONUCLEASAS ESPECÍFICAS DE ESTRUCTURA 20

5.1. Yen1/GEN1 20

5.2. Slx1-Slx4/SLX1-SLX4 21

5.3. Mus81-Mms4/MUS81-EME1 23

5.4. Rad1-Rad10/XPF-ERCC1 27

OBJETIVOS 29

MATERIALES Y MÉTODOS 33

1. MATERIALES 35

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* 35

1.2. Cepas de *Escherichia coli* 36

1.3. Plásmidos 36

1.4. Oligonucleótidos 37

1.5. Medios de cultivo 40

1.6. Anticuerpos 41

1.7. Reactivos y enzimas 41

2. MÉTODOS 42

2.1. Cultivo y transformación de *E. coli* 42

2.2. Cultivos celulares de *S. cerevisiae* y sincronización en el ciclo celular 42

2.3. Construcción de cepas de *S. cerevisiae* 43

2.4. Citometría de flujo 44

2.5. Ensayos de sensibilidad al tratamiento con MMS 45

2.6. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos 45

2.7. Hibridación de DNA con sondas radiactivas 47

2.8. Extracción de proteínas 48

2.9. Electroforesis de proteínas e inmunoblot 48

2.10. Ensayos fosfatasa 49

2.11. Ensayos de actividad nucleasa 50

2.12. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas 51

RESULTADOS 53

1. Mms4 se modifica durante el ciclo celular	55
2. Mms4 está modificada en células bloqueadas en G2/M	56
3. La modificación de Mms4 se mantiene a lo largo de la mitosis	58
4. La modificación de Mms4 dependiente de la progresión en el ciclo celular es una fosforilación	59
5. La fosforilación de Mms4 depende de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) Cdc28 ...	60
6. La fosforilación de Mms4 depende de la quinasa del tipo Polo (PLK) Cdc5	63
7. La fosforilación de Mms4 no depende de ciclinas específicas	66
8. La expresión ectópica de Cdc5 (PLK) induce la fosforilación prematura de Mms4	69
9. La fosforilación de Mms4 se correlaciona con una alta actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4	71
10. La actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4 está reducida en un mutante de <i>mms4</i> defectivo en fosforilación	73
11. La deficiencia en la fosforilación de Mms4 aumenta la sensibilidad de las células que carecen de la helicasa del tipo RecQ Sgs1 a agentes que causan daño en el DNA o estrés replicativo	75
12. La formación del complejo Mus81-Mms4 no depende de la fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4	78
13. La fosforilación de Mms4 no depende de la formación del complejo Mus81-Mms4	79
14. La activación de Mus81-Mms4 ocurre cuando las células acaban la fase S, incluso en presencia de lesiones de DNA que interfieren con la replicación cromosómica	80
15. La ausencia de Sgs1 o Yen1 no tiene efecto sobre la regulación de Mus81-Mms4	84
16. Las células deficientes en el <i>checkpoint</i> de la fase S no pueden prevenir la actividad de Mus81-Mms4 durante la replicación cromosómica bajo condiciones de daño en el DNA	88

DISCUSIÓN 93

1. Mms4, la subunidad no catalítica del complejo Mus81-Mms4, se fosforila durante el ciclo celular, y esta modificación depende de Cdc28 (CDK) y Cdc5 (PLK)	95
2. La fosforilación de Mms4 es necesaria para la actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4	97
3. ¿Cómo se produce la activación de la endonucleasa Mus81-Mms4?	99
4. Regulación de la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 en condiciones de daño en el DNA	100
5. Desregulación de la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4	101
6. Regulación de la actividad de Mus81-Mms4/EME1 en diferentes organismos	103
7. Consideraciones finales	105

CONCLUSIONES 107

BIBLIOGRAFÍA 111

ABREVIATURAS

AP	<i>Apurinic or apyrimidinic site</i>	Sitio apurínico o apirimidínico
ATP	<i>Adenosin-triphosphate</i>	Adenosina trifosfato
BER	<i>Base excision repair</i>	Reparación por escisión de bases
BIR	<i>Break induced replication</i>	Replicación inducida por rotura
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	Seroalbúmina bovina
C-terminal		Carboxilo-terminal
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>	Quinasa dependiente de ciclina
CPD	<i>Cyclobutane pyrimidine dimer</i>	Dímeros de pirimidina ciclobutano
CPT	<i>Camptothecin</i>	Camptotecina
dCTP	<i>2'-deoxy-cytidine-5'-triphosphate</i>	2'-deoxicitidina-5'-trifosfato
DDT	<i>DNA damage tolerance</i>	Tolerancia al daño en el DNA
dHJ	<i>double Holliday Junction</i>	Unión de Holliday doble
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	<i>Deoxynucleotides triphosphate</i>	Desoxinucleótidos trifosfato
DSB	<i>Double strand break</i>	Rotura de doble cadena
DSBR	<i>Double strand break repair</i>	Reparación de roturas de doble cadena
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	<i>Ethyleneglycol tetraacetic acid</i>	Ácido etilenglicol tetraacético
EMS	<i>Ethyl methanesulfonate</i>	Etil metano sulfonato
3'-FL	<i>3'-Flap</i>	
5'-FL	<i>5'-Flap</i>	
GG-NER	<i>Global Genome NER</i>	Reparación global del genoma por escisión de nucleótidos
HhH	<i>Helix Hairpin Helix</i>	Hélice Horquilla Hélice
HJ	<i>Holliday junction</i>	Unión de Holliday
HR	<i>Homologous recombination</i>	Recombinación homóloga
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	Peroxidasa de rábano
HU	<i>Hydroxyurea</i>	Hidroxiurea
ICL	<i>Inter-strand crosslink</i>	Puente intercatenario
MMR	<i>Mismatch repair</i>	Reparación de apareamientos erróneos
MMS	<i>Methyl methanesulfonate</i>	Metil metanosulfonato
N-terminal		Amino-terminal
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>	Unión de extremos no homólogos
4-NQO	<i>4-Nitroquinoline 1-oxide</i>	4-nitroquinolina 1-óxido
nHJ	<i>Nick Holliday junction</i>	Unión de Holliday con mella
OH	<i>Hydroxyl group</i>	Grupo hidroxilo
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	Marco de lectura abierto
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	Antígeno nuclear de células en proliferación
P	<i>Phosphate group</i>	Grupo fosfato

ABREVIATURAS

PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBD	<i>Polo Box Domain</i>	Dominio de unión de proteínas tipo Polo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	<i>Polyethylene glycol</i>	Polietilenglicol
RF	<i>Replication Fork</i>	Horquilla de replicación
RFC	<i>Replication Fork Complex</i>	Complejo de la horquilla de replicación
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ácido ribonucleico
RPA	<i>Replication protein A</i>	Proteína de replicación A
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Dodecil sulfato sódico
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand annealing</i>	Reasociación de cadenas dependiente de síntesis
SSA	<i>Single strand annealing</i>	Reasociación de cadenas sencillas
ssDNA	<i>Single stranded DNA</i>	DNA de cadena sencilla
SSE	<i>Structure Specific Endonuclease</i>	Endonucleasa específica de estructura
TAE	<i>Tris/Acetate/EDTA</i>	Tris/Acetato/EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline/Tween 20</i>	Tampón Tris-salino/Tween 20
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>	Ácido tricloroacético
TC-NER	<i>Transcription-coupled NER</i>	Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a transcripción
TE	<i>Tris/EDTA</i>	Tris/EDTA
TGS	<i>Tris/Glycine/SDS</i>	Tris/Glicina/SDS
TLS	<i>Translesion syntesis</i>	Síntesis a través de lesiones
Tm	<i>Melting temperature</i>	Temperatura de fusión
UV	<i>Ultraviolet</i>	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. DAÑO EN EL DNA Y ESTABILIDAD GENÓMICA

El mantenimiento de la estabilidad del genoma en cada ciclo celular es esencial para la supervivencia de las células y para evitar situaciones patológicas que pueden derivar en envejecimiento prematuro, enfermedades como el cáncer o anomalías durante el desarrollo (Aguilera y Garcia-Muse, 2013; Branzei y Foiani, 2010). Para que la integridad del genoma se preserve y la información genética pueda transmitirse fielmente, es necesario que las células repliquen de manera precisa sus cromosomas antes de dividirse y los segreguen correctamente en la mitosis (Bell y Labib, 2016). La complejidad intrínseca de estos procesos, no exenta de errores, hace necesaria la existencia de mecanismos de control que garanticen una eficiente replicación y segregación del material genético. Una dificultad añadida importante es la inevitable presencia de daño en el DNA, que interfiere con dichos procesos, constituyendo una amenaza para la integridad del genoma (Aguilera y Garcia-Muse, 2013; Branzei y Foiani, 2010). El daño en el DNA provoca alteraciones en su composición y en su estructura. Las lesiones en el material genético son especialmente relevantes durante la replicación cromosómica, ya que frecuentemente dificultan o impiden el funcionamiento de las horquillas de replicación, provocando paradas y colapsos de las mismas que pueden derivar en una replicación del genoma defectuosa o incompleta, o incluso en roturas cromosómicas.

Las células hacen frente a la presencia de daño en el DNA gracias a mecanismos de vigilancia –*checkpoints*– y a diferentes rutas de reparación y tolerancia al daño en el material genético. Las lesiones en el DNA deben ser detectadas y después reparadas o toleradas para que la replicación cromosómica se complete con éxito, siendo esencial la actuación y coordinación de estas rutas para el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Cuando las horquillas de replicación quedan bloqueadas por lesiones en el DNA o por el estrés replicativo, se activa el *checkpoint* de la fase S. Este mecanismo, mediado por Mec1 y Rad53 en *S. cerevisiae* (ATR y Chk2 en células humanas), estabiliza las horquillas de replicación, inhibe la activación de nuevos orígenes de replicación, impide la progresión en la mitosis hasta que el problema se soluciona y coordina una respuesta celular que hace posible la reparación o tolerancia de las lesiones y la posterior reanudación de la replicación (Giannattasio y Branzei, 2017; Segurado y Tercero, 2009; Yazinski y Zou, 2016). Para eliminar el daño en el DNA, las células utilizan diferentes rutas de reparación del DNA según el tipo de lesiones en el material genético (Branzei y Foiani, 2008). Con frecuencia pueden requerir además la cooperación de varias de ellas para replicar un DNA dañado (Vazquez *et al*, 2008). Cuando las lesiones no pueden ser reparadas, los

mecanismos de tolerancia al daño en el DNA (DDT) las evitan e impiden que las horquillas queden bloqueadas, permitiendo que la replicación se complete, aun a costa –según la rama de DDT utilizada- de introducir mutaciones (Branzei y Psakhye, 2016; Chang y Cimprich, 2009; Saugar *et al*, 2014). Muchas rutas de reparación del DNA, así como algunos mecanismos de DDT, originan intermediarios de DNA que deben resolverse para que estos procesos finalicen con éxito y la replicación pueda completarse. En un gran número de casos, la necesaria resolución de los intermediarios de DNA se produce gracias a la rotura nucleolítica llevada a cabo por endonucleasas específicas de estructura, las cuales tienen por tanto un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Ciccina *et al*, 2008; Dehe y Gaillard, 2017; Rass, 2013; Sarbajna y West, 2014).

Muchos de los conocimientos que se han adquirido sobre estos procesos se deben a la utilización en investigación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Gracias a la conservación evolutiva de los principales mecanismos moleculares, a su facilidad de manipulación genética y al conocimiento que se tiene de su genoma, este organismo constituye un excelente modelo eucariótico de trabajo que hemos utilizado a lo largo de esta tesis.

2. TIPOS DE DAÑO EN EL DNA

A pesar de que el DNA es una molécula bastante estable, se encuentra expuesto de forma constante e inevitable a agentes y situaciones que originan alteraciones en su estructura y composición (Figura I1). Esto pone en riesgo la integridad del genoma, especialmente durante la fase S, cuando las células replican sus cromosomas. Si bien el origen del daño en el material genético es complejo y diverso, puede clasificarse en endógeno, cuando es originado por el propio metabolismo celular, y exógeno o medioambiental, cuando está provocado por agentes externos a la célula.

El daño en el DNA endógeno es en gran medida el resultado de reacciones de oxidación e hidrólisis. Estas originan con frecuencia desaminaciones, pérdida de bases y modificaciones en el DNA por estrés oxidativo, las cuales pueden provocar mutaciones (Barnes y Lindahl, 2004; Hoeijmakers, 2001). Las especies reactivas del oxígeno (ROS), productos del metabolismo de las células, pueden también originar roturas de cadena sencilla (Bjelland y Seeberg, 2003). Estas lesiones pueden posteriormente derivar en otras más perjudiciales, como roturas de banda doble (DSB). Asimismo, durante la replicación del DNA se incorporan bases no habituales o

incorrectas, como el uracilo, o análogos como el 5-bromouracilo (Barnes y Lindahl, 2004).

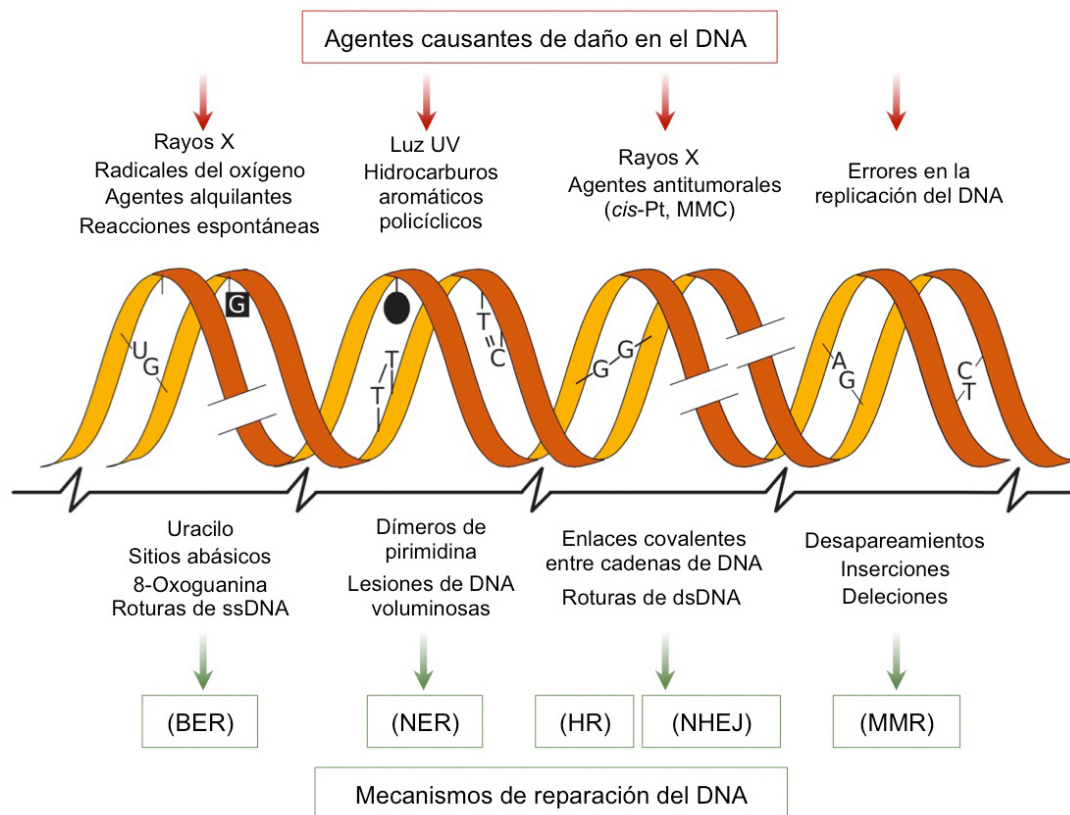


Figura 11. Ejemplos de posibles agentes causantes de daño en el DNA, lesiones producidas y principales mecanismos de reparación. Basado en Hoeijmakers (2001).

El daño en el DNA exógeno es consecuencia de la acción de múltiples agentes medioambientales, como las radiaciones ionizantes, la luz ultravioleta (UV) y numerosos compuestos químicos de distinto tipo que causan lesiones en el material genético. Las radiaciones ionizantes dañan las bases del DNA, originando derivados de las mismas y también provocando roturas en el DNA, tanto de cadena sencilla como de cadena doble (Ward, 1990). La radiación por luz UV genera principalmente enlaces covalentes que originan dímeros de pirimidina ciclobutano y diversos fotoproductos, los cuales modifican la estructura del DNA y dificultan el apareamiento de las bases (Husain *et al*, 1988). La luz UV genera también lesiones asociadas con el daño oxidativo en el DNA, como el 8-oxoG, y algunas uniones covalentes del DNA a proteínas. La variedad de productos químicos que pueden causar daño en el material genético es muy amplia. Pueden destacarse los agentes alquilantes (Shrivastav *et al*, 2010), como el metil metanosulfonato (MMS, utilizado en esta tesis) o el etil

metanosulfonato (EMS), y otros naturales, como el metil clorhídrico o la S-adenosilmetionina, un alquilante intracelular. Entre los compuestos que dañan el DNA también cabe mencionar los agentes que originan uniones covalentes entre las cadenas del DNA, como el cisplatino, la mitomicina o el ácido nitroso, algunos de los cuales se han utilizado en quimioterapia. Otro grupo está representado por agentes que tras una activación metabólica se convierten en formas reactivas mutagénicas (Guengerich, 2000), como la nitrosoguanidina, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (como el benzopireno), las aminas aromáticas, las N-nitrosaminas o las aflatoxinas. Entre los compuestos químicos que originan roturas en el DNA pueden destacarse el antitumoral bleomicina o la zeocina (Povirk, 1996), así como algunos inhibidores de las topoisomerasas como la camptotecina y el etopósido (Ferguson y Baguley, 1996).

3. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA

Como se ha mencionado previamente, para mantener la estabilidad del genoma las células utilizan distintas rutas de reparación del DNA que permiten eliminar las lesiones en el material genético. Los principales mecanismos de reparación en células eucarióticas se describen a continuación, centrándonos especialmente en los conocimientos procedentes de los trabajos realizados con *S. cerevisiae*, el organismo modelo utilizado en esta tesis.

3.1. Reversión directa del daño en el DNA

La reversión directa de la lesión en el DNA es el modo más sencillo de reparar el material genético, y se produce mediante una reacción en un solo paso catalizada por una enzima especializada (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013). Sin embargo, por razones cinéticas o termodinámicas, únicamente un número limitado de lesiones en el DNA pueden ser reparadas por este mecanismo. Un ejemplo es la fotorreactivación de los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) por una fotoliasa de DNA. En *S. cerevisiae*, la fotoliasa Phr1 se activa mediante la absorción de energía azul o UV, y se transfiere al CPD originando una especie inestable que se rompe y restaura la estructura del DNA (Sancar, 2003). Otro ejemplo es la reacción catalizada por la metiltransferasa Mgt1 de *S. cerevisiae* (MGMT en células humanas), en la que esta proteína repara las O⁴-metilimina y O⁶-metilguanina mediante la transferencia irreversible del grupo metilo al centro activo de la enzima, tras lo que pierde su capacidad catalítica (Xiao *et al*, 1991).

3.2. Reparación de apareamientos erróneos (MMR)

Este mecanismo es muy importante para prevenir mutagénesis, ya que elimina los apareamientos incorrectos de bases que escapan a la acción correctora de las polimerasas, así como las pequeñas deleciones, inserciones o bucles que pueden producirse como consecuencia de errores en la replicación del DNA (Jiricny, 2006; Kunkel y Erie, 2005) (Figura I1). La ruta MMR (*Mismatch Repair*) funciona en la fase S y comienza con el reconocimiento del problema por Msh2, que forma un heterodímero con Msh6 o Msh3. Posteriormente se produce el reclutamiento de los complejos Mlh1/Pms1 de *S. cerevisiae* (MLH1/PMS2 en células humanas), Mlh1/Mlh2 (MLH1/PMS1 en células humanas) y Mlh1/Mlh3. Estos complejos interaccionan con PCNA y provocan su desplazamiento junto con RFC, facilitando el reclutamiento de la exonucleasa Exo1, que lleva a cabo el procesamiento de la lesión mediante la degradación de la cadena en dirección 5'→3'. A continuación, la polimerasa δ rellena el hueco de DNA de cadena sencilla, estabilizado por RPA, y después la DNA ligasa I (Cdc9 en *S. cerevisiae*) sella la rotura, completándose la reparación (Jiricny, 2006; Kunkel y Erie, 2005).

3.3. Reparación por escisión de bases (BER)

La mayoría de las modificaciones químicas en las bases de los nucleótidos, causadas por alquilación, daño oxidativo, desaminación o hidrólisis espontánea, así como la incorporación de bases inapropiadas, se reparan por la ruta BER (*Base Excision Repair*) (Lindahl, 2001) (Figura I1). En esta ruta, una DNA-N-glicosilasa corta el enlace N-glicosídico entre la base dañada o inapropiada y la desoxirribosa, generando un sitio AP (apurínico o apirimidínico) en el DNA. En levaduras existen cinco DNA-glicosilasas, pertenecientes a dos clases: la primera está formada por enzimas monofuncionales que solo catalizan el corte del enlace N-glicosídico, como Ung1 y Mag1 (esta rompe el enlace glicosídico entre la 3-metil adenina y la desoxirribosa; Chen *et al*, 1990); la segunda está integrada por enzimas bifuncionales DNA-glicosilasas/APliastas que catalizan tanto el corte del enlace N-glicosídico como la eliminación del esqueleto fosfodiéster en los sitios AP, e incluye a Ntg1, Ntg2 y Ogg1. Los sitios AP, que también se originan por la hidrólisis espontánea de bases, son potencialmente mutagénicos y altamente citotóxicos, y son procesados por AP endonucleasas o por las AP liastas/glicosilasas mencionadas anteriormente. En *S. cerevisiae*, la principal actividad AP endonucleasa se lleva a cabo por Apn1, teniendo Apn2 un papel minoritario. Tras la acción de la glicosilasa, Apn1 realiza el corte en el

extremo 5' del sitio AP resultante, originando una rotura de banda simple con un extremo 5'-desoxirribosa fosfato. A diferencia de las células de mamíferos, las levaduras no presentan una actividad similar a la realizada por la DNA polimerasa β , que puede actuar como polimerasa y como AP liasa en la reparación por BER cuando se elimina la base dañada y se reemplaza por un solo nucleótido (tramo corto o *short patch* de BER en células de mamífero). En *S. cerevisiae*, el grupo 3'-hidroxilo se extiende uno o varios nucleótidos por las DNA polimerasas δ o ϵ y, finalmente, la desoxirribosa abásica se elimina por la 5'-*flap* endonucleasa Rad27 para facilitar la ligación por una DNA ligasa, probablemente Cdc9 (Lindahl, 2001; Ma *et al*, 2008). Rad27 es homóloga de Fen1 en células humanas, que interviene en estas en el tramo largo de BER (*long patch*) en el que se elimina un fragmento de varios nucleótidos y se sintetiza una nueva secuencia para reemplazarlo.

Además de esta ruta BER mayoritaria, algunos sitios AP pueden ser procesados por las AP liasas/glicosilasas Ntg1, Ntg2 u Ogg1, implicadas fundamentalmente en la reparación del daño oxidativo en el DNA. Estas llevan a cabo un corte en el extremo 3' de los sitios AP y dan lugar a una 3'-desoxirribosa-fosfato que a continuación se procesa por la actividad fosfodiesterasa de Apn1 y Apn2. Alternativamente, tras la actuación de una helicasa, podría formarse una estructura 3'-*flap* que sería procesada por la endonucleasa Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1 en células humanas). La reparación se completa con la síntesis de DNA y su posterior ligación (Guillet y Boiteux, 2002; Lindahl, 2001; Ma *et al*, 2008).

3.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

La reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*) es una vía versátil que reconoce las distorsiones que las lesiones ocasionan en el DNA, por lo que puede reparar daños diversos (Figura I1). La ruta NER es importante durante la fase G1 del ciclo celular, si bien puede actuar también en otras fases del ciclo. Entre las lesiones en el DNA que se reparan por NER se encuentran las producidas por la luz ultravioleta (UV) y las distorsiones originadas por compuestos que provocan uniones covalentes entre cadenas del DNA. Además, la ruta NER desarrolla una función de salvaguardia en la eliminación de lesiones causadas por oxidación y alquilación que no son reparadas por BER.

Existen dos subramas de NER: reparación acoplada a transcripción, TC-NER (*Transcription-Coupled NER*), que repara el daño en el DNA que la RNA polimerasa encuentra a su paso, y reparación global del genoma, GG-NER (*Global Genome NER*), cuando NER actúa sobre lesiones en el DNA a lo largo del genoma que no se

encuadran en la vía anterior (de Laat *et al*, 1999). En *S. cerevisiae*, la detección de la distorsión del DNA que producen las lesiones se lleva a cabo por Rad4 y Rad23 (XPC y HR23B en células humanas). El reconocimiento de la lesión requiere además la actuación de Rad16/Rad7/Abf1 (en GG-NER) y de Rad26/Rpb9 (en TC-NER). La demarcación de la región a escindir está determinada por el complejo TFIIH, que se recluta a continuación y está formado por 10 subunidades, entre ellas las helicasas Rad3 y Rad25 (XPD y XPB en células humanas), que permiten la apertura de la doble hélice alrededor de la lesión. Posteriormente se une Rad14 (XPA en humanos), que discrimina junto con TFIIH la hebra dañada y ocasiona el desmantelamiento de los factores de reconocimiento Rad4 y Rad23, contribuyendo al reclutamiento del complejo de incisión tras la unión de RPA a la cadena sencilla de DNA expuesta. La incisión se lleva a cabo por las endonucleasas Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1 en células humanas) y Rad2 (XPG). Estas reconocen la cadena dañada y realizan cortes a ambos lados de la lesión (Rad1-Rad10 en el lado 5' y Rad2 en el lado 3'), resultando un hueco de DNA de cadena sencilla de unos 25-30 nucleótidos, que se rellena mediante nueva síntesis de DNA y se sella por una ligasa, lo que da lugar a la restauración de la doble hélice de DNA libre de daño (Costa *et al*, 2003; de Laat *et al*, 1999).

3.5. Reparación de roturas de doble cadena (DSBR)

En los tipos de reparación explicados anteriormente, el daño en el DNA se circunscribe a una de las cadenas del mismo, lo que permite que, tras eliminar la lesión, la cadena no dañada se emplee como molde para la reparación. Sin embargo, esta posibilidad no existe cuando se producen roturas de doble cadena (DSB, *Double Strand Breaks*), una de las lesiones más graves que pueden producirse en el DNA. La reparación de las DSB puede tener lugar por dos vías diferentes: recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*) y unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) (Heyer *et al*, 2010; Lieber, 2010; Mehta y Haber, 2014) (Figuras I1 y I2). HR necesita un DNA homólogo que actúe como molde, y opera en las fases S y G2 del ciclo celular, siendo la vía principal de reparación de DSB en *S. cerevisiae*. Por el contrario, NHEJ opera en G1, es un proceso frecuentemente mutagénico y tiene un papel minoritario.

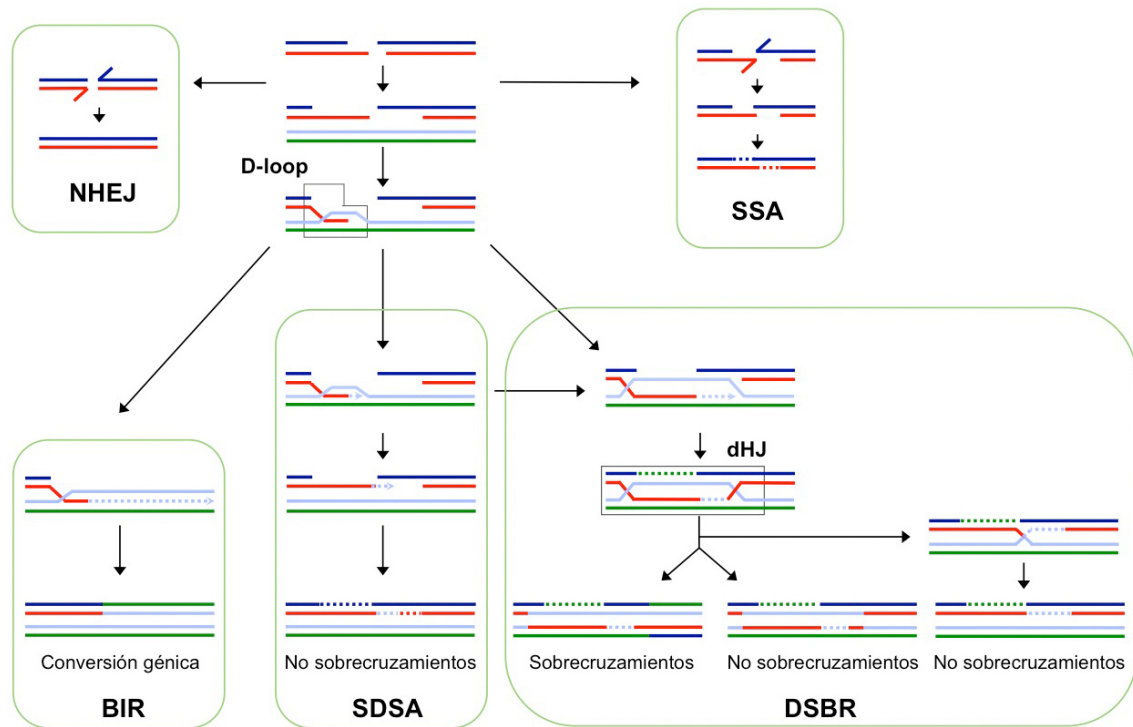


Figura I2. Esquema de las rutas de reparación de roturas de doble cadena en el DNA (DSB). Las diferentes rutas se explican en el texto. NHEJ: unión de extremos no homólogos; SSA: reasociación de cadenas sencillas; SDSA: reasociación de cadenas dependiente de síntesis; DSBR: reparación de rotura de doble hebra; BIR: replicación inducida por rotura. dHJ: unión de Holliday doble. Las líneas quebradas indican nueva síntesis de DNA. Basado en Heyer *et al* (2010).

3.5.1. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ)

En *S. cerevisiae*, la ruta de NHEJ (Figura I2) se inicia por el reconocimiento de los extremos de la DSB por el complejo Ku70/Ku80, que se une a ellos protegiéndolos de la degradación y marcándolos como sitios de daño. Esto promueve el reclutamiento del complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2 en células humanas), que hace posible el contacto entre los extremos de la rotura. Posteriormente se une al sitio de la rotura un tercer complejo formado por la ligasa Dnl4 y el factor asociado Lif1 (DNA ligasa IV/XRCC4 en células humanas), que promueve el procesamiento y relleno del sitio de corte mediante el reclutamiento de la endonuclease Rad27 y de la polimerasa Pol4. Una vez generados los extremos religables, Dnl4 sella el corte y la reparación se completa (Daley *et al*, 2005; Hefferin y Tomkinson, 2005). El carácter mutagénico de este proceso de reparación se debe a que durante el procesamiento del DNA puede producirse la pérdida o sustitución de varios nucleótidos (Lieber, 2010).

3.5.2. Reparación por recombinación homóloga (HR)

La recombinación homóloga (HR) (Figura I2) tiene un papel importante en la reparación de las roturas de doble cadena en el DNA. Además, participa en varios procesos biológicos importantes, como la tolerancia al daño en el DNA, el mantenimiento de la longitud de los telómeros en células que carecen de telomerasa y del número de copias del DNA ribosomal, así como en la correcta segregación cromosómica en la primera división meiótica. Asimismo, puede intervenir en el restablecimiento de las horquillas de replicación rotas o bloqueadas (Li y Heyer, 2008; Lisby *et al*, 2001). No obstante, la recombinación es también potencialmente peligrosa, ya que puede originar reordenamientos cromosómicos e intermediarios letales (Kolodner *et al*, 2002), por lo que debe estar muy regulada. La reparación de roturas de doble cadena por HR se lleva a cabo mediante la copia de secuencias de DNA homólogas intactas, preferentemente del cromosoma homólogo no dañado o de la cromátida hermana, que sirven como molde para restaurar la información genética perdida en el sitio o región de la rotura (Paques y Haber, 1999; Symington, 2002).

En la reparación de DSB, la recombinación homóloga se inicia con el reconocimiento del sitio de corte por el complejo MRX, formado por Mre11/Rad50/Xrs2 en *S. cerevisiae* (MRE11/RAD50/NBS1 en células humanas) (Heyer *et al*, 2010). La actividad endonucleasa de Mre11 y la nucleasa Sae2 fosforilada inician la resección, produciéndose la degradación exonucleolítica de los extremos 5' que han quedado libres tras producirse la DSB, lo que origina pequeñas regiones de ssDNA con extremos 3'-OH libres. La actividad CDK durante la fase S facilita esta resección y previene el mecanismo de NHEJ (Ira *et al*, 2004). A continuación, se realiza la extensión del tramo reseccionado mediante la nucleasa Exo1 o, alternativamente, por la acción de la helicasa Sgs1 y de la nucleasa Dna2. Posteriormente se produce el revestimiento de los extremos 3'-OH libres por RPA y la interacción de esta última con Rad52, esencial en la recombinación en *S. cerevisiae* (Mortensen *et al*, 1996). Rad52 interacciona a su vez con Rad51 y facilita su deposición sobre el DNA de cadena sencilla, reemplazando a RPA. Tras ello, el extremo 3' revestido de Rad51 invade el fragmento de DNA homólogo donador de información y se genera una región de DNA heterodúplex y una estructura de bucle de desplazamiento, o *D-loop* (*Displacement-loop*), produciéndose un intercambio de cadenas entre las moléculas implicadas. Todo ello permite cebar la síntesis de DNA sobre la secuencia homóloga invadida, que actúa como molde. Otras proteínas como Rad54 y Rad55 contribuyen a este proceso. Una vez formado el *D-loop*, las células pueden proceder de distintas maneras para finalizar el proceso de reparación (Krogh y Symington, 2004; Pardo *et al*, 2009; Sung y

Klein, 2006), según sean uno o dos los extremos de la rotura de doble cadena que encuentran homología (Figura I2). Estas diferentes posibilidades se explican a continuación.

3.5.2.1. Reparación de un corte de doble cadena con dos extremos homólogos

Una posibilidad es que este proceso ocurra mediante reparación de rotura de doble hebra o DSBR (Double Strand Break Repair) (Figura I2). La hebra que queda desplazada al formarse el bucle o *D-loop* se utiliza por el extremo 3'-OH libre como molde para la síntesis de DNA, y ambos extremos del corte se ven implicados en la reparación con la molécula donadora de información. Tras la ligación, se generan dos estructuras cruciformes de DNA duplexo -estructuras de Holliday (HJs, *Holliday Junctions*)- que necesitan ser procesadas para que puedan restablecerse las dos cadenas del DNA intactas. El procesamiento de las HJs puede ser por disolución, en cuyo caso se produciría la migración de ambas de forma convergente hasta su resolución, sin que exista sobrecruzamiento, o por corte endonucleolítico, lo que podrá dar lugar a sobrecruzamientos o a conversión génica, según la orientación de corte de las dos HJs. La resolución de las HJs mediante disolución en *S. cerevisiae* se lleva a cabo por el complejo formado por la helicasa Sgs1, la topoisomerasa Top3 y Rmi1 (BLM, TopoIII α y RMI1/RMI2 en células humanas, complejo BTR) (Chang *et al*, 2005; Ira *et al*, 2003; Mullen *et al*, 2005). En la resolución de las HJs por procesamiento nucleolítico intervienen resolvasas específicas. Así, la endonucleasa específica de estructura Yen1 de *S. cerevisiae* (GEN1 en células humanas), tiene actividad resolvasa *in vitro* e *in vivo*, y puede realizar cortes simétricos en las HJs según el modelo establecido para la resolvasa clásica de *E. coli* RuvC (Ip *et al*, 2008). La resolución de las HJs puede llevarse a cabo por otras dos endonucleasas específicas de estructura, los heterodímeros Mus81-Eme1/Mms4 y Slx1/Slx4, que actúan como resolvasas no canónicas, produciendo normalmente cortes asimétricos (Ciccio *et al*, 2003; Ehmsen y Heyer, 2008; Gaillard *et al*, 2003; Wyatt *et al*, 2013).

La reparación de un corte de doble cadena con dos extremos homólogos también puede ocurrir mediante la reasociación de cadenas dependiente de síntesis o SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) (Figura I2). En este caso, La síntesis de DNA tiene lugar a partir de un extremo 3'-OH invasor, utilizando el DNA homólogo intacto como molde. La cadena sintetizada se desplaza de este mediante la acción de helicasas y se empareja con las secuencias complementarias en el otro extremo del corte. Si se sobrepasa la zona de homología, el extremo 3' sobrante se procesa nucleolíticamente. El hueco generado se rellena mediante síntesis de DNA y se sella

posteriormente. Este mecanismo no produce sobrecruzamientos ni alteraciones de la cadena duplexa donante, y constituye la vía mayoritaria de reparación de las DSBs (Paques y Haber, 1999; Symington, 2002).

Por último, también puede producirse la reparación mediante la reasociación de cadenas sencillas o SSA (*Single Strand Annealing*) (Figura I2). Este proceso tiene lugar cuando la DSB se localiza entre repeticiones directas de secuencias de DNA. Si las cadenas sencillas generadas tras el procesamiento de los extremos de la DSB son lo suficientemente extensas, Rad52 media el emparejamiento entre las secuencias homólogas, y las colas de ssDNA sobrantes son procesadas por la endonucleasa específica de estructura Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1), que actúa sobre 3'-flaps. Se produce por tanto una delección entre las dos regiones homólogas, por lo que esta ruta es considerada mutagénica (Heyer *et al*, 2010; Kass y Jasin, 2010). El proceso de SSA no requiere intercambio de cadenas, y no necesita la intervención de Rad51, pero sí requiere, además de Rad52, la actuación de Rad59 (homólogo del anterior) y de RPA.

3.5.2.2. Reparación de un corte de doble cadena con un extremo

Cuando solo un extremo del corte encuentra homología con otra región, la reparación de la DSB puede producirse por el mecanismo de replicación inducida por rotura o BIR (*Break-Induced Replication*) (Anand *et al*, 2013; Mehta y Haber, 2014) (Figura I2). En este caso, el extremo 3'-OH único invade la cadena homóloga y, tras la formación del *D-loop*, sirve de cebador para la síntesis de DNA hasta el final del cromosoma. Este proceso conlleva la conversión génica de grandes regiones de DNA, puede resultar en una pérdida de heterocigosis a gran escala y dar lugar incluso a la duplicación de un brazo cromosómico.

4. MECANISMOS DE TOLERANCIA AL DAÑO EN EL DNA

A pesar de la eficiencia de los mecanismos de reparación del DNA, algunas lesiones pueden quedar sin reparar, y aquellas que permanecen en el momento de la replicación cromosómica pueden interferir con la progresión de las horquillas de replicación. Las células utilizan estrategias que les permiten replicar el DNA dañado sin necesidad de eliminar las lesiones, conocidas como mecanismos de tolerancia al daño en el DNA (DDT, *DNA Damage Tolerance*) o de baipás del daño. Gracias a estos, y aun a costa de introducir mutaciones, dependiendo del tipo de DDT utilizado, la replicación de los cromosomas puede completarse cuando existen lesiones no reparadas (Branzei y Psakhye, 2016; Saugar *et al*, 2014).

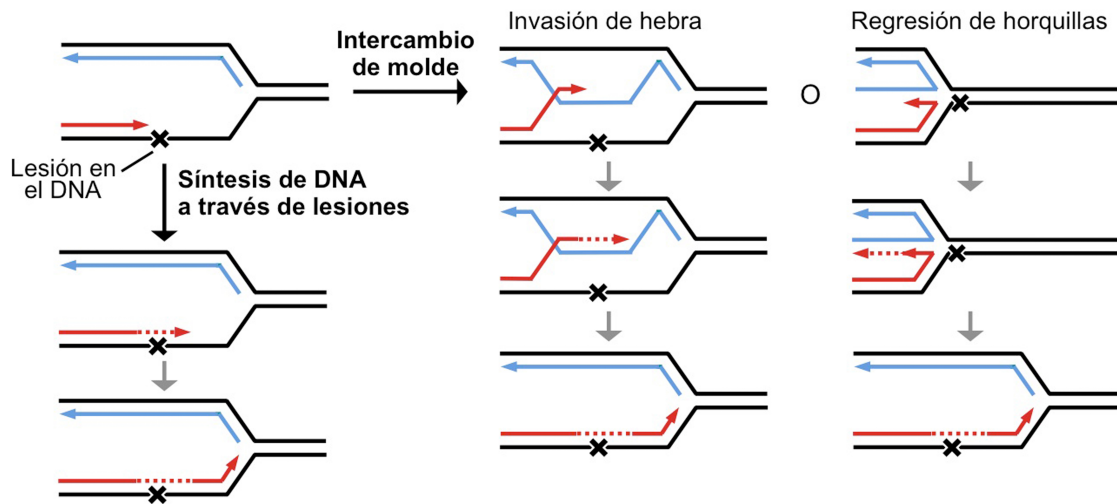


Figura I3. Esquema de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA mediados por la ruta *RAD6/RAD18*. El baipás de las lesiones no reparadas (representadas por una X) que originan bloqueos de las horquillas de replicación puede llevarse a cabo por síntesis de DNA a través de lesiones (TLS) o por intercambio de molde. TLS se lleva a cabo por polimerasas especializadas capaces de replicar a través de las lesiones. Durante el mecanismo de cambio de molde, la cadena naciente bloqueada usa temporalmente la cadena recién sintetizada, no dañada, de la cromátida hermana como molde para replicar la zona que contiene la lesión. El intercambio de molde requiere la invasión del dúplex de DNA homólogo por la hebra naciente bloqueada, lo que da lugar a un intermediario de recombinación que debe resolverse. En el baipás de las lesiones asociado a las horquillas de replicación, el intercambio de molde podría ocurrir además por regresión de la horquilla de replicación bloqueada y su posterior reversión una vez que se ha sintetizado el DNA complementario al del sitio de la lesión. Por simplificación, el esquema muestra únicamente lesiones en la cadena líder del DNA y el baipás del daño asociado a las horquillas de replicación. No obstante, este baipás puede realizarse también post-replicativamente. Basado en Saugar *et al* (2014).

En células eucarióticas, la tolerancia al daño en el DNA se lleva a cabo principalmente por las proteínas de la ruta *RAD6/RAD18*, muy conservada evolutivamente. Esta ruta consta de dos ramas o vías que definen dos modos diferentes de tolerancia al daño: síntesis de DNA a través de lesiones (TLS) y rama de intercambio de molde o de evitación del daño (Branzei y Psakhye, 2016; Saugar *et al*, 2014) (Figura I3). La primera utiliza DNA polimerasas especializadas –de baipás– que replican directamente a través de la lesión, en un proceso que frecuentemente es propenso a errores y mutagénico (Sale, 2013). En la segunda rama, la cadena de DNA naciente bloqueada por la lesión utiliza como molde la hebra recién sintetizada no dañada de la cromátida hermana, en un proceso que recuerda a la recombinación homóloga (Branzei y Szakal, 2016). Esta rama está mediada en *S. cerevisiae* por Rad51 (HLP1/SHPRH en células humanas) y el heterodímero Mms2/Ubc13. Dado que se evita la región dañada al replicar el DNA, el proceso está libre de errores y no es mutagénico.

En ausencia de daño en el DNA, PCNA está sumoilada, lo que permite el reclutamiento de la helicasa Srs2, que inhibe la recombinación homóloga durante una

replicación normal. La ruta *RAD6/RAD18* se activa cuando, como consecuencia del bloqueo de una horquilla de replicación por una lesión en el DNA, se produce el desacoplamiento entre la helicasa y las polimerasas replicativas. Esto conlleva la formación de fragmentos largos de DNA de cadena sencilla que se recubren por la proteína RPA. Este DNA recubierto actúa como señal para el reclutamiento de la E3-ubiquitina ligasa Rad18 a la cromatina, que a su vez recluta Rad6, una E2-ubiquitina conjugadora (Davies *et al*, 2008). Rad18 y Rad6 forman un heterodímero y monoubiquitan PCNA en el residuo conservado Lys164. Esta modificación de PCNA, encontrada en todos los eucariotas, es el paso central en la iniciación del *baipás* del daño en el DNA. El DNA de cadena sencilla recubierto por RPA es también la señal de activación para el *checkpoint* de la fase S, pero a pesar de esta señal común no hay aparentemente interdependencia entre ambos procesos (Davies *et al*, 2008).

La monoubiquitación de PCNA activa la vía TLS (Stelter y Ulrich, 2003), facilitando el reclutamiento de las polimerasas de *baipás* y la sustitución de las polimerasas replicativas por estas. Las polimerasas de *baipás* o TLS son enzimas no procesivas de baja fidelidad, que carecen de actividad correctora y tienen sitios activos flexibles que pueden acomodar bases modificadas, lo que les permite replicar a través de las lesiones en el DNA (Sale, 2013). En *S. cerevisiae* existen tres polimerasas de TLS: Rad30 (Pol η) y Rev1, de la familia Y, y Pol ζ , de la familia B, compuesta por las subunidades Rev3 (catalítica) y Rev7. En células humanas existe un mayor número de polimerasas con actividad TLS: Pol η (POLH), REV1, Pol κ (POLK) y Pol ι (POLI), de la familia Y; Pol ζ , formada por REV3L (subunidad catalítica) y REV7 (MAD2L2), de la familia B; Pol ν (POLN) y Pol θ (POLQ), de la familia A, y PrimPol, de la familia AEP. PCNA monoubiquitada puede resultar posteriormente modificada mediante la formación de una cadena de poliubiquitinas en la Lys164, unidas entre sí por Lys63 (Hoegge *et al*, 2002). La poliubiquitación de PCNA promueve la vía de *baipás* del daño mediante intercambio de molde, y está mediada por la E3-ubiquitina ligasa Rad5^{HLTF/SHPRH} y la E2-ubiquitina conjugadora Mms2-Ubc13. Rad5 posee también actividad ATPasa/helicasa dependiente de DNA, la cual es importante para el intercambio de molde. Se han propuesto dos mecanismos para explicar este proceso: invasión de hebra, que podría ser asociada a las horquillas de replicación o actuar post-replicativamente, y regresión de horquillas, según el esquema de la Figura I3.

5. ENDONUCLEASAS ESPECÍFICAS DE ESTRUCTURA

Las endonucleasas específicas de estructura (SSE) procesan diferentes intermediarios de DNA que se originan durante la replicación, la reparación y la recombinación del DNA, así como durante la transcripción, y tienen por tanto un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del genoma (Ciccia *et al*, 2008; Dehe y Gaillard, 2017). Las SSE reconocen como sustratos estructuras de DNA específicas en lugar de secuencias o modificaciones del material genético. Existen varias familias de SSE conservadas evolutivamente, y los miembros de cada familia comparten un dominio catalítico conservado y procesan los intermediarios de DNA con una determinada polaridad. En la mayoría de los casos, las SSE pueden procesar más de un tipo de sustrato. A continuación, se resumen las características principales de las SSE de eucariotas que consideramos más relevantes para la resolución de intermediarios de DNA en los procesos de reparación y recombinación del DNA, con especial atención a Mus81-Mms4/EME1, cuyo estudio es el objetivo de esta tesis.

5.1. Yen1/GEN1

La endonucleasa Yen1 de *S. cerevisiae* y su homóloga humana GEN1 pertenecen a una subclase de la familia Rad2/XPG de endonucleasas (Ip *et al*, 2008; Lieber, 1997). Dentro de esta familia se incluyen otras nucleasas como XPG, implicada en NER, y FEN1, que actúa sobre 5'-*flaps* e interviene en la maduración de los fragmentos de Okazaki durante la replicación del DNA. Las proteínas de esta familia poseen un dominio XPG en el extremo amino-terminal (XPG-N), un dominio nucleasa situado en la región central (XPG-I) y un dominio hélice-horquilla-hélice (HhH, *Helix-hairpin-Helix*) que flanquea el dominio nucleasa (Lieber, 1997; Tsutakawa *et al*, 2011). Yen1 y GEN1 se identificaron como las primeras endonucleasas eucarióticas canónicas, que pueden procesar HJ de forma similar a la resolvasa bacteriana de referencia RuvC (Ip *et al*, 2008). Al igual que RuvC, Yen1/GEN1 se une a las HJs y las resuelve mediante una incisión doble que produce una rotura simétrica. Esto es posible gracias a la capacidad de Yen1/GEN1 para ensamblarse en las HJs en forma de dímero, lo que permite la coordinación de dos sitios activos alineados simétricamente (Rass *et al*, 2010). Estas proteínas pueden actuar además sobre 5'-*flaps*, horquillas de replicación y uniones de Holliday con mella (Ip *et al*, 2008; Rass *et al*, 2010). Además de su capacidad para escindir HJs *in vitro*, existen numerosas evidencias sobre su papel como resolvasa *in vivo* (Gao *et al*, 2012; Lorenz *et al*, 2010; Mankouri *et al*, 2011; O'Neil *et al*, 2013).

A pesar del importante papel de Yen1/GEN1, tanto las células de *S. cerevisiae* como las células humanas que carecen de esta endonucleasa no muestran prácticamente sensibilidad al tratamiento con diferentes agentes que causan daño en el DNA o estrés replicativo, y no presentan diferencias con respecto a las células del tipo silvestre en cuanto a crecimiento, viabilidad o formación de sobrecruzamientos (Blanco *et al*, 2010; De Muyt *et al*, 2012; Ho *et al*, 2010; Svendsen *et al*, 2009; Wyatt *et al*, 2013). Esto se explica por la redundancia funcional con otras nucleasas y, de hecho, en *S. cerevisiae* la actividad de Yen1 solo parece estrictamente necesaria en ausencia de la endonucleasa Mus81-Mms4 (Blanco *et al*, 2010; Ho *et al*, 2010). Asimismo, en células humanas, la eliminación transitoria de GEN1 junto con MUS81, SLX1 o SLX4 produce un fenotipo aditivo en cuanto a anormalidades cromosómicas, pérdida de viabilidad celular o frecuencia de intercambio entre cromátidas hermanas (Garner *et al*, 2013; Sarbajna y West, 2014; Wechsler *et al*, 2011; Wyatt *et al*, 2013). Además, estos fenotipos son especialmente acusados en ausencia de la helicasa BLM/Sgs1, lo que indica que tanto la disolución como la resolución por rotura nucleolítica de intermediarios de DNA son importantes para la eliminación de estructuras que pueden impedir la progresión en el ciclo celular.

En *S. cerevisiae*, esta endonucleasa está regulada mediante fosforilación y localización nuclear. Así, durante la fase S, la fosforilación de Yen1 por Cdk promueve su exclusión del núcleo e inhibe su actividad catalítica. En anafase, Cdc14 desfosforila Yen1, facilitando su relocalización nuclear y su activación, lo que limita su actuación a la mitosis (Blanco *et al*, 2014). En células humanas, sin embargo, el control de GEN1 se ejerce exclusivamente por relocalización celular, de forma independiente de fosforilación (Chan, 2014). Esta relocalización está dirigida por una señal de exclusión nuclear que restringe la presencia de la proteína en el núcleo a la mitosis y limita por tanto su acción a esta fase del ciclo.

5.2. Slx1-Slx4/SLX1-SLX4

Los genes *SLX1* y *SLX4* fueron identificados por primera vez en *S. cerevisiae* en un ensayo de letalidad sintética en búsqueda de proteínas necesarias para la viabilidad celular en ausencia de *SGS1* (Mullen *et al*, 2001). Slx1 y Slx4 también son esenciales en ausencia de la helicasa Rqh1 (Sgs1) en *Schizosaccharomyces pombe* (Coulon *et al*, 2004) y la misma letalidad sintética se da entre los genes correspondientes en organismos como *Drosophila* (Andersen *et al*, 2011) y *Caenorhabditis elegans* (Agostinho *et al*, 2013; Saito *et al*, 2013). Las proteínas SLX1 y SLX4 se han encontrado también en células humanas (Fekairi *et al*, 2009; Munoz *et al*

al, 2009; Svendsen *et al*, 2009), y en todos los organismos forman un heterodímero estable, en el que Slx1/SLX1 es la subunidad catalítica.

Slx1 pertenece a la superfamilia de endonucleasas GIY-YIG (Dunin-Horkawicz *et al*, 2006). Contiene un dominio endonucleasa conservado UvrC-intron (URI) en la región amino-terminal y un dominio en dedo de zinc del tipo RING/PHD en el extremo carboxilo-terminal. Al contrario que Slx1, Slx4 presenta mayor diversidad evolutiva en su secuencia. No obstante, tanto en células humanas como en levaduras, Slx4/SLX4 presenta un dominio SAP conservado en el extremo carboxilo-terminal que interviene en la unión al DNA y en la especificidad de sustrato de la proteína. En células humanas, SLX4 es una proteína multidominio que presenta funciones de andamiaje para la unión de otras proteínas, entre las que se encuentran las endonucleasas específicas de estructura MUS81-MMS4 y XPF-ERCC1 (Rad1-Rad10 en *S. cerevisiae*) (Andersen *et al*, 2009; Fekairi *et al*, 2009; Munoz *et al*, 2009; Svendsen *et al*, 2009). Recientemente se ha encontrado que Slx4 también interacciona con Mus81-Mms4 a través de Dpb11 (Gritenaite *et al*, 2014).

In vitro, los complejos Slx1-Slx4 de *S. cerevisiae* y SLX1-SLX4 de células humanas muestran actividad sobre una gran variedad de estructuras ramificadas de DNA, como 5' y 3'-*flaps*, horquillas de replicación, estructuras en forma de Y y uniones de Holliday (Coulon *et al*, 2004; Fricke y Brill, 2003; Wyatt *et al*, 2013). En levaduras, los mutantes *slx1Δ* y *slx4Δ* no muestran defectos en el crecimiento, la segregación cromosómica o la eficiencia de esporulación (Mullen *et al*, 2001). Sin embargo, son sensibles al MMS (Fricke y Brill, 2003) y tienen altos niveles de reordenamientos cromosómicos espontáneos (Zhang *et al*, 2006). Asimismo, la eliminación transitoria de SLX1 o SLX4 en células somáticas provoca sensibilidad a la camptotecina y a otros agentes genotóxicos que causan ICLs (*inter-strand crosslinks*) (Andersen *et al*, 2009; Fekairi *et al*, 2009; Munoz *et al*, 2009; Svendsen *et al*, 2009). Además, los defectos observados cuando la actividad de SLX1-SLX4 es defectiva están incrementados en ausencia de BLM (Sgs1) o en presencia de daño exógeno en el DNA (Castor *et al*, 2013; Garner *et al*, 2013; Wyatt *et al*, 2013). Por otra parte, se han identificado mutaciones bialélicas del gen *SLX4* en pacientes con anemia de Fanconi, una enfermedad genética poco frecuente caracterizada por hipersensibilidad a agentes inductores de ICLs, aplasia medular, inestabilidad genómica y predisposición a diversos tipos de cáncer (Kim *et al*, 2011; Stoepker *et al*, 2011).

5.3. Mus81-Mms4/MUS81-EME1

Mus81 (*MMS and ultraviolet sensitive protein 81*) (MUS81 en células humanas) fue identificada por su interacción con la proteína de recombinación Rad54 en *S. cerevisiae* (Interthal y Heyer, 2000) y con la quinasa del *checkpoint* Cds1 en *S. pombe* (Boddy *et al*, 2000). Mms4 (EME1 en *S. pombe*, células humanas y plantas; Mms4 en *S. cerevisiae* y *Drosophila*) fue descrita inicialmente en *S. cerevisiae* tras la identificación de *MMS4* como un gen necesario para la resistencia al agente alquilante MMS (Xiao *et al*, 1998). Ambos genes, *MUS81* y *MMS4*, fueron también identificados en un ensayo de letalidad sintética con mutantes *sgs1Δ* (Mullen *et al*, 2001). Las proteínas Mus81 y Mms4 pertenecen a la familia XPF (Ciccia *et al*, 2008; Osman y Whitby, 2007) y, como otros miembros de la misma, forman un complejo heterodimérico ampliamente conservado en eucariotas, en el que Mus81 constituye la subunidad catalítica y Mms4/EME1 la subunidad no catalítica, siendo ambas necesarias para la actividad endonucleasa (Kaliraman *et al*, 2001).

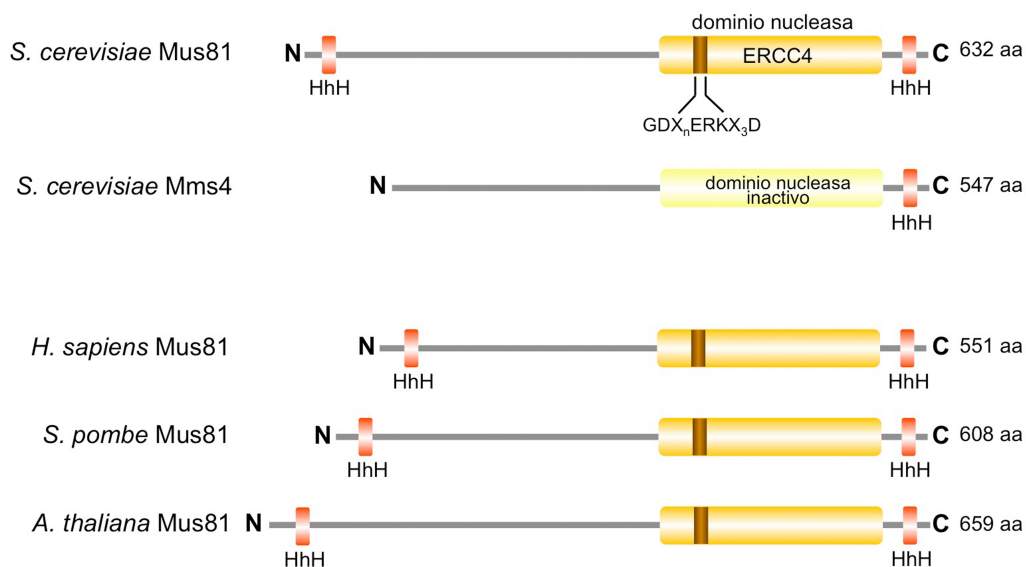


Figura I4. Estructura de la endonucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* donde se señalan los dominios más relevantes. En Mus81, la subunidad catalítica del complejo, se indican los dominios HhH en ambos extremos de la proteína, así como el dominio con actividad nucleasa ERCC1. Se resalta dentro de este el motivo catalítico G-D-X_n-E-R-K-X₃-D. En la subunidad Mms4 se indica el dominio HhH, así como el dominio nucleasa inactivo presente en la mitad C-terminal. En la figura se incluye también un esquema de la subunidad catalítica Mus81 en otros organismos, donde se observa la conservación evolutiva de esta endonucleasa.

Mus81 contiene un dominio nucleasa ERCC4 (*Excision Repair Cross Complementation group 4*) en la mitad C-terminal, característico de la familia XPF, que incluye el motivo catalítico G-D-X_n-E-R-K-X₃-D (Chang *et al*, 2008; Nishino *et al*, 2003; 2005) (Figura I4). Asimismo, posee dos motivos Hélice-horquilla-hélice (HhH), situados

en ambos extremos de la proteína, a diferencia del resto de los miembros de la familia, donde estos forman un tándem en el extremo C-terminal (Ciccía *et al*, 2008). Estos motivos participan en la dimerización y en la unión de la nucleasa al DNA y son necesarios para su actividad catalítica (Newman *et al*, 2005; Nishino *et al*, 2008; Nishino *et al*, 2005). La subunidad no-catalítica Mms4/EME1 presenta un dominio HhH en su extremo carboxilo-terminal, así como un dominio nucleasa defectivo e inactivo (Figura I4). La región carboxilo-terminal es importante para la interacción de esta subunidad con Mus81, y podría también contribuir a la unión del complejo al DNA (Ciccía *et al*, 2003; Fu y Xiao, 2003; Mullen *et al*, 2001).

Numerosos estudios bioquímicos han mostrado que Mus81-Mms4/EME1 actúa *in vitro* sobre una gran variedad de estructuras ramificadas de DNA, con diferente afinidad (Figura I5), como horquillas de replicación, 3'-*flaps*, *D-loops* y estructuras con forma de X e Y (Bastin-Shanower *et al*, 2003; Boddy *et al*, 2001; Chen *et al*, 2001; Ciccía *et al*, 2003; Doe *et al*, 2002; Ehmsen y Heyer, 2008; Fricke *et al*, 2005; Gaillard *et al*, 2003; Kaliraman *et al*, 2001; Osman *et al*, 2003; Taylor y McGowan, 2008; Whitby *et al*, 2003). A diferencia de lo propuesto inicialmente (Boddy *et al*, 2001), Mus81 no se comporta como una resolvasa clásica, por lo que no corta con eficiencia HJs intactas (Ehmsen y Heyer, 2008; Fricke *et al*, 2005). No obstante, como se ha mencionado anteriormente, diversos estudios han demostrado que existe interacción física entre SLX1-SLX4 y MUS81-EME1 en células humanas, y la actividad resolvasa sobre HJs sí podría darse en un contexto celular, como resultado de la acción de un macro-complejo SLX1-SLX4/MUS81-EME1 (Castor *et al*, 2013; Garner *et al*, 2013; Wyatt *et al*, 2013). Este macro-complejo podría resolver secuencialmente las HJs intactas: SLX1 catalizaría la primera incisión y MUS81 llevaría a cabo un segundo corte en la hebra opuesta. El complejo SLX/MUS constituiría, por tanto, una resolvasa no-canónica que promovería el corte asimétrico de HJs. Dado que se ha encontrado también una interacción entre Slx4 y Mus81-Mms4 en *S. cerevisiae*, si bien a través de Dpb11 (Gritenaite *et al*, 2014), quizás podría darse una situación similar en levaduras.

Mus81-Mms4/EME1 contribuye al procesamiento de los intermediarios producidos durante la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el material genético, ya que los mutantes *mus81Δ* y *mms4Δ* de *S. cerevisiae* son sensibles a distintos agentes que dañan el DNA impidiendo el avance de las horquillas de replicación (Bastin-Shanower *et al*, 2003; Boddy *et al*, 2000; Doe *et al*, 2002; Interthal y Heyer, 2000; Kai *et al*, 2005; Xiao *et al*, 1998). Además, esta endonucleasa se requiere durante la reparación de horquillas de replicación rotas (Roseaulin *et al*, 2008). Es importante destacar que Mus81-Mms4/EME1 es necesaria incluso en ausencia de agentes genotóxicos exógenos, dado que su falta causa altos niveles de

reordenamientos cromosómicos en *S. cerevisiae* (Zhang *et al*, 2006; Smith *et al*, 2004), así como aberraciones cromosómicas en células de mamífero (Abraham *et al*, 2003; McPherson *et al*, 2004; Dendouga *et al*, 2005; Hiyama *et al*, 2006; Wechsler *et al*, 2011). Estos datos indican que los sustratos de Mus81-Mms4/EME1 se producen como consecuencia de la inducción del daño en el DNA, pero también en células que proliferan normalmente, y que su procesamiento es necesario para preservar la estabilidad del genoma (Osman y Whitby, 2007).

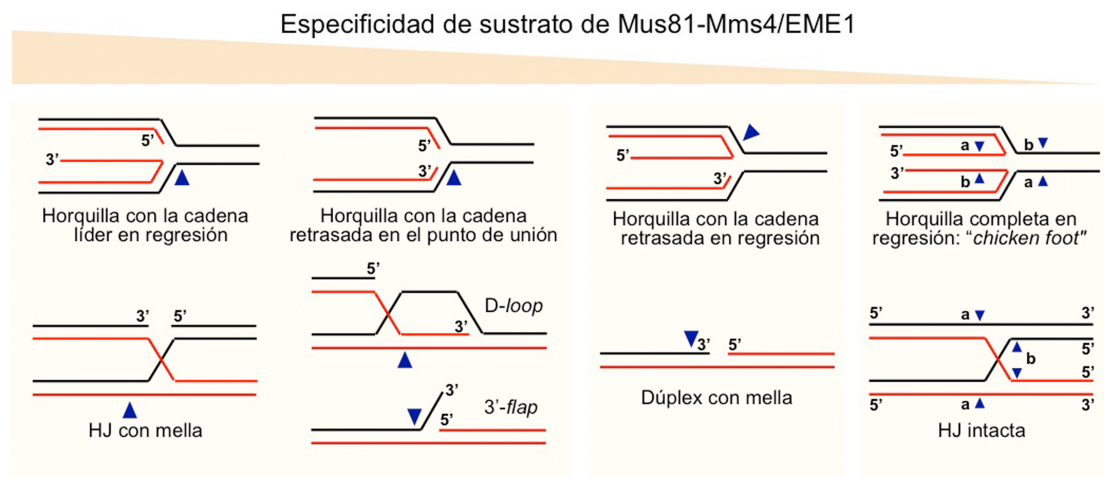


Figura I5. Sustratos de la endonucleasa Mus81-Mms4/EME1 y especificidad sobre los mismos. Los diversos tipos de estructuras sobre los que esta nucleasa puede actuar se representan de izquierda a derecha en orden decreciente de especificidad. Los sitios de corte se indican con triángulos. Basado en Osman y Whitby (2007).

En *S. cerevisiae*, los mutantes *mus81* y *mms4* muestran letalidad sintética con mutaciones del complejo helicasa ReqQ Sgs1/Top3/Rmi1 (BLM-TOPIIIa-RMI1-RMI2 en células humanas, complejo BTR). El mismo requerimiento de Mus81 para la viabilidad celular en ausencia de la helicasa RecQ se ha encontrado en *S. pombe*, *Drosophila* y *Arabidopsis* (Boddy *et al*, 2000; Doe *et al*, 2002; Hartung *et al*, 2006; Trowbridge *et al*, 2007). Asimismo, las células humanas deficientes en BLM requieren MUS81 para la viabilidad y la formación de intercambios entre cromátidas hermanas (Castor *et al*, 2013; Wechsler *et al*, 2011; Wyatt *et al*, 2013). Esta letalidad sintética se suprime en levaduras por mutaciones que previenen las primeras etapas de la recombinación homóloga (Bastin-Shanower *et al*, 2003; Fabre *et al*, 2002; Kaliraman *et al*, 2001; Mullen *et al*, 2001), lo que indica que los complejos Mus81 y RecQ constituyen vías alternativas pero complementarias (resolución nucleolítica y disolución, respectivamente) que permiten el procesamiento de intermediarios de DNA durante la reparación mediada por recombinación (Osman y Whitby, 2007). Es importante señalar que, si bien los mutantes *slx1* y *slx4* son también sintéticamente

letales con los mutantes *sgs1/rqh1* (Coulon *et al*, 2004; Mullen *et al*, 2001), esta letalidad no se suprime eliminando la recombinación homóloga (Fricke y Brill, 2003), como sucede con *mus81/mms4*. Esto sugiere que, a pesar de que Mus81-Mms4 y Slx1-Slx4 tienen sustratos comunes *in vitro*, actúan sobre diferentes estructuras de DNA *in vivo*.

Como se ha comentado previamente, Mus81-Mms4/EME1 tiene también funciones complementarias con Yen1/GEN1. Así, en *S. cerevisiae*, la delección de *YEN1* incrementa la sensibilidad de las células carentes de Mus81 al daño en el DNA causado por el MMS, la luz UV o la CPT (Blanco *et al*, 2010; Tay y Wu, 2010). Dado que como ya se ha explicado, y a diferencia de los mutantes *mus81Δ*, los mutantes *yen1Δ* son poco o nada sensibles al tratamiento con los agentes genotóxicos anteriormente citados (Blanco *et al*, 2010), esto sugiere que Mus81-Mms4 es la principal vía de resolución nucleolítica de los intermediarios de DNA generados a consecuencia de las lesiones producidas por dichos agentes. Yen1 podría ser necesaria en algunas circunstancias, como la ausencia de Mus81 o tras la formación de estructuras que quizás esta última no pueda procesar con eficacia (Blanco *et al*, 2010; Ho *et al*, 2010). De acuerdo con esta idea, los estudios realizados en células procedentes de pacientes con síndrome de Bloom han mostrado que el silenciamiento conjunto de *MUS81* y *GEN1* provoca un importante número de anomalías cromosómicas (Wechsler *et al*, 2011). Sin embargo, el silenciamiento único de *MUS81* en las mismas células no genera un efecto similar, lo que sugiere que GEN1 puede compensar su función. Confirmando la relación funcional y el solapamiento en la actuación de ambas proteínas, la expresión de GEN1 humana en *S. pombe*, que carece de ortólogos de *GEN1/YEN1*, alivia los defectos en meiosis de las células *mus81Δ* en este organismo (Lorenz *et al*, 2010).

A pesar de que la función de Mus81-Mms4/EME1 en la resolución de determinados intermediarios de DNA es muy importante para el mantenimiento de la estabilidad del genoma, su actividad nucleolítica podría causar, paradójicamente, inestabilidad genómica. Una acción incontrolada de esta endonucleasa sobre sus posibles sustratos, que incluyen horquillas de replicación y diferentes estructuras secundarias de DNA, podría ser altamente perjudicial para la replicación cromosómica. Asimismo, podría inducir la formación de reordenamientos cromosómicos, niveles elevados de intercambios entre cromátidas hermanas y posible pérdida de heterocigosidad. Por ello, la actividad de Mus81-Mms4/EME1 debería estar altamente controlada en las células. Cuando iniciamos esta tesis doctoral, la regulación de esta endonucleasa *in vivo* era completamente desconocida, y por ello nos planteamos investigar cómo se llevaba a cabo, estudio que hemos realizado en este trabajo.

5.4. Rad1-Rad10/XPF-ERCC1

La endonucleasa Rad1-Rad10 de *S. cerevisiae* (XPF-ERCC1 en células humanas) pertenece a la familia XPF, como Mus81-Mms4. Rad1 (XPF) es la subunidad catalítica, y forma un complejo heterodimérico estable con la subunidad no catalítica Rad10 (ERCC1), el cual es necesario para la actividad endonucleasa (Tomkinson *et al*, 1993). Rad10/ERCC1 podría ser importante para la unión del complejo al DNA (Tsodikov *et al*, 2005). Al igual que Mus81, Rad1 posee un dominio nucleasa ERCC4 en la mitad C-terminal, pero también contiene un dominio nucleasa inactivo en el extremo N-terminal (Ciccía *et al*, 2008). Tanto Rad1-Rad10 como XPF-ERCC1 actúan sobre diversos tipos de intermediarios de DNA, entre los que se incluyen 3'-*flaps*, estructuras con forma de burbuja, estructuras con forma de Y o D-loops (Ciccía *et al*, 2008).

Rad1-Rad10/XPF-ERCC1 es esencial para la escisión de lesiones en el DNA producidas por la luz UV (Reynolds *et al*, 1981; Westerveld *et al*, 1984), tanto en levaduras como en células humanas, y tiene por tanto un papel importante en la ruta NER. Los enfermos de xerodermia pigmentosa, una enfermedad rara hereditaria de la piel, presentan, entre otras, mutaciones en *XPF* (Sijbers *et al*, 1996). Rad1-Rad10 y XPF-ERCC1 están también implicadas en ciertos tipos de reparación del DNA por recombinación homóloga, como SSA, proceso en el que esta endonucleasa actúa procesando y eliminando estructuras del tipo 3'-*flap*. Otro aspecto interesante de esta endonucleasa es su posible relación con el envejecimiento, ya que los ratones deficientes en XPF o ERCC1, pero no en otros componentes de NER, muestran un buen número de defectos característicos de envejecimiento prematuro (Prasher *et al*, 2005). Asimismo, un síndrome progeroide humano, conocido como XFE, está causado por una mutación de *XPF* (Niedernhofer *et al*, 2006). Por otra parte, se ha identificado una mutación de *ERCC1* que causa defectos en el desarrollo y muerte prematura (Jaspers *et al*, 2007). Todo ello indica la importancia de esta endonucleasa en los procesos de envejecimiento y desarrollo.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es contribuir al conocimiento de los procesos que las células eucarióticas utilizan para mantener la estabilidad del genoma cuando proliferan.

Los objetivos específicos son:

1. Estudiar la regulación de la endonucleasa específica de estructura Mus81-Mms4 de *Saccharomyces cerevisiae* durante el ciclo celular mitótico.
2. Analizar la regulación de la actividad de la endonucleasa Mus81-Mms4 en condiciones de daño en el DNA.
3. Determinar las implicaciones de la regulación de Mus81-Mms4 para su función en la resolución de intermediarios de DNA y su importancia para el mantenimiento de la integridad del genoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Todas las cepas de levadura utilizadas en este trabajo derivan de W303 (Thomas y Rothstein, 1989), a excepción de la cepa YMG3, que deriva de A364A (Hartwell, 1967). Los mutantes *cdc15-2*, *cdc5-1* y *cdc28-td* fueron proporcionados por el Dr. J.F.X. Diffley (The Francis Crick Institute, Reino Unido). Todos los genotipos se detallan en la Tabla M1.

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN
W303-1a	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(Thomas and Rothstein, 1989)
W303-1b	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(Thomas and Rothstein, 1989)
A364A	<i>MATa ade1 ade2 ura1 his7 lys2 tyr1 gal1 SUC mal cup BIO</i>	(Hartwell, 1967)
YJT161	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 yen1Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YMG1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 cdc28Δ::cdc28-td::URA3 ubr1Δ::P_{GAL1,10}-Myc-UBR1::HIS3 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMG2	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ubr1Δ::P_{GAL1,10}-Myc-UBR1::URA3 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMG3	<i>MATa ade1 ade2 tyr1 his7 lys2 gal1-1 cdc5-1 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMG6	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 clb5Δ::URA3 clb6Δ::LEU2 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMG7	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 sgs1Δ::kanMX4</i>	Esta tesis
YMG9	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 sgs1Δ::kanMX4 yen1Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YMG10	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 mms4Δ::URA3 yen1Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YMG11	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 mms4Δ::URA3::P_{ADH1}-3HA-mms4-np (S55A; S56A; S184A; S201A; S221A; S222A; S301A; T302A; S403A)::HIS3</i>	Esta tesis
YMG12	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 natNT2 mms4Δ::URA3::P_{ADH1}-3HA-mms4-np (S55A; S56A; S184A; S201A; S221A; S222A; S301A; T302A; S403A)::HIS3 sgs1Δ::kanMX4</i>	Esta tesis
YMG13	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 natNT2 mms4Δ::URA3::P_{ADH1}-3HA-mms4-np (S55A; S56A; S184A; S201A; S221A; S222A; S301A; T302A; S403A)::HIS3 yen1Δ::LEU2</i>	Esta tesis

YMG14	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 nat-NT2 mms4Δ::URA3::P_{ADH1}-3HA-mms4-np (S55A; S56A; S184A; S201A;S221A; S222A; S301A; T302A; S403A)::HIS3 sgs1Δ::kanMX4 yen1Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YMG21	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 sgs1Δ::kanMX4 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMG24	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 Ylp211-P_{Gal1}, 10⁻CDC5::URA3 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMG45	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 clb1Δ::URA3 clb2-VI clb3Δ::TRP1 clb4Δ::HIS3 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMG49	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 cdc15-2 omns P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMV20	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 MUS81-3HA::HIS3MX6</i>	Esta tesis
YMV33	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMV38	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMV42	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 mus81Δ::KanMX4 MMS4-3HA::natNT2</i>	Esta tesis
YMV48	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1 -100 mms4Δ::URA3</i>	Esta tesis
YSG22	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 MMS4-TAP::kanMX4</i>	Esta tesis
YSG56	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1 -100 sgs1Δ::kanMX4 yen1Δ::LEU2 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YSG45	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-yeGFP-MUS81::natNT2 P_{ADH1}-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YSG65	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-3HA-MUS81::natNT2 P_{ADH1}-yeGFP-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis

Tabla M1. Lista de las cepas de levadura utilizadas en esta tesis y detalle de sus genotipos.

1.2. Cepas de *Escherichia coli*

En este trabajo se utilizó la estirpe DH5-α: F⁻, (ϕ 80*lacZ*Δ*M15*), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (*r*_K⁻, *m*_K⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*) *U169* (Hanahan, 1983).

1.3. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta tesis pertenecen a las series pRS, pML, pFA6a, pYM y Ylp211, y se relacionan en la Tabla M2.

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN
pRS303	<i>pBluescript (KS+)-HIS3</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS304	<i>pBluescript (KS+)-TRP1</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS305	<i>pBluescript (KS+)-LEU2</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS306	<i>pBluescript (KS+)-URA3</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pUG6	<i>loxP-kanMX-loxP (Derivado de pFA6-kanMX4)</i>	(Güldener <i>et al</i> , 1996)
pML6	<i>pFA6a-GFP(s65T)-His3MX6</i>	(Longtine <i>et al</i> , 1998)
pML9	<i>pFA6a-3HA-His3MX6</i>	(Longtine <i>et al</i> , 1998)
pYM13	<i>pFA6a-TAP-KanMX4</i>	(Janke <i>et al</i> , 2004)
pYM-N8	<i>pFA6a-pADH1-3HA-natNT2</i>	(Janke <i>et al</i> , 2004)
pYM-N9	<i>pFA6a-pADH1-yeGFP-natNT2</i>	(Janke <i>et al</i> , 2004)
Ylp211	<i>Ylplac211-URA3</i>	Helle Ulrich (IMB, Mainz)
pKL30	<i>pRS306-pGal1,10-Myc-UBR1-URA3</i>	John Diffley (The Francis Crick Institute, UK)
pMG2	<i>pRS303-pADH1-mms4-np-HIS3</i>	Esta tesis
pMG3	<i>Ylplac 211-pGal1,10-CDC5-URA3</i>	Esta tesis

Tabla M2. Plásmidos empleados en esta tesis.

1.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis fueron sintetizados por Invitrogen. Los empleados en la construcción y comprobación de cepas de levaduras aparecen listados en la Tabla M3. Los oligonucleótidos utilizados para formar las estructuras de DNA sintéticas empleadas en los ensayos nucleasa se recogen en la Tabla M4.

NOMBRE	SECUENCIA
Kan FW	5 ' CCTCGACATCATCTGCCC3 '
Kan RE	5 ' GGATGTATGGGCTAAATG3 '
His FW	5 ' GAATGATCATCACCGTAGTG3 '
His RE	5 ' CGTTTATCTTGCCTGCTCAT3 '
HIS-re-2	5 ' GTTCTTATGTAGTGACACCG3 '
Leu FW	5 ' CATCGAATTTGATTCTGTGC3 '
Leu RE	5 ' GTAAAGGAATACAGGTAAGC3 '
Trp FW	5 ' CAGTGCAGCTTACAGAAAC3 '
Trp RE	5 ' CCGCAAACTTTACCAATGG3 '
Ura FW	5 ' GACATGGGTGGAAGAGATGA3 '

Ura RE	5 ' GAACATCCAATGAAGCACAC3 '
Nat-1	5 ' CTAATCTCGAGGCGAATTTTC3 '
Nat-2	5 ' CGTCAAGAGTGGTACCCATG3 '
5'-NterTAG-mms4	5 ' CGTAAATAAAGAACAATGTATGGATTATGGTATAGAATAATAGTAGTCACATA TTGCAGCTAGTTAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC3 '
5-NterTAG-MMS4 (-60)	5 ' AAAGGGCTTGCAACGCGTTGAAGTACCCTTTTCACGAAAAAATGGTTGTATA CGTAAATCGTACGCTGCAGGTCGAC3 '
3'-NterTAG-mms4	5 ' GTCCATCGATGATCTGAATACTGGCATCGTTTCTTGAATCTTTGTCTCAACA AAATCAACGATCTGGCTCATCGATGAATTCTCTGTCG3 '
5'MMS4 TAPtagging	5 ' ATTGTACAACTGTTTACTTGTACTGATCCAAATGATACTATTGAAGGTCGAC GGATCCCCGGTTAATTAATCCATGGAAGAGAAGATGGAAGAAAT3 '
MMS4 tag test FW	5 ' ATGTCGTGAGCCTATACCCC3 '
5'-del. mms4	5 ' AAAGAACAATGTATGGATTATGGTATAGAATAATAGTAGTCACATATTGCAGC TAGTTAACATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3 '
3'-del. mms4	5 ' TGCAGTGATTTTCAAACGACTGCCTTAAGGTATGTTCTTATATACAAAGTTT CGTTCGACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG3 '
5'-del-ADHp-3HA-MMS4	5 ' ATACCAAGCATACAATCAACTCCAAGCTGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCC CCCCGGACATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3 '
5'-test del mms4	5 ' GTTGATGAGACACCTTTGCT3 '
3'-test del mms4	5 ' AGGACAGACTTAATGAAGAC3 '
MMS4-fw-1 (seq5)	5 ' GTCCGACAGAGAATTCATCG3 '
MMS4-fw-2 (seq6)	5 ' GCCTATTGCTGTTGACTGCG3 '
MMS4-fw-3 (seq7)	5 ' CGCTCGAAAAACATTAACGGC3 '
MMS4-fw-4 (seq8)	5 ' TGTGATTCTTATACTAAGCG3 '
MMS4-fw-5 (seq9)	5 ' AAATACTTGATGACTGAGGC3 '
MMS4-RE	5 ' GAGACGAATCTATGATGG3 '
MMS4-re-2	5 ' GGATCCATGCGCTGTTTTCC3 '
5'-del.mus81/Kan(B)	5 ' CTTTAAGAGTGGCATCAACATTGGCGTAAACAAAGTTTCAAAGGATTGATACG AACACACATTCTTAGCATGAAAGCATGCAGCTGAAGCTTCGTACGC3 '
3'-del.mus81/Kan(B)	5 ' TATAAACCTTGCAGGGATGACTATATTTCAAATTGCTAAAGTTTACCAAAAG CATCATATATCTTTTCTGAAAGAGATTTCATAGGCCACTAGTGGATCTG3 '
5'-test del mus81	5 ' CGTAATGTATTGGGCACCTT3 '
3'-test del mus81	5 ' GTCAAAGGTTTGTCACTGGA3 '
5' mus81-tag	5 ' GGTGCGAAGAAAATTACTAAATCTCTTTCAGAAAAGATATATGATGCTTTTGG TAAACTTCGGATCCCCGGTTAATTA3 '
3' mus81-tag	5 ' GAATATCATCACTTTTTTCTTATAAAACCTTGCAGGGATGACTATATTTCAA ATTGCTAGAATTCGAGCTCGTTAAAC3 '
5'-NterTAG-mus81	5 ' GGCATCAACATTGGCGTAAACAAAGTTTCAAAGGATTGATACGAACACACATT CCTAGCATGAAAGCATGCGTACGCTGCAGGTCGAC3 '
3'-NterTAG-mus81	5 ' TAGGGGTTAATCCGTCAACTAATTCTTGTAAACCATTCAATATATAGGTCTTTT AAGTTTGATGAGAGTTCCATCGATGAATTCTCTGTCG3 '
oligo 5' del. Clb1	5 ' AGAGCCAAAATATTTTCGTCCGTTATATCAACCATCAAAGGAAGCTTTAATCT TCTCATACATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3 '
oligo 3' del. clb1	5 ' TATAAATAGATGATAAAGTAAGGAAGTGAGATTTTGGTTTTCTGTGTAGGCT AGCACCTCGCATCTGTGCGGTATTTACACCG3 '
oligo 5' test CLB1	5 ' TAGGGTGATCTATTCTAGGC3 '
oligo 3' test. CLB1	5 ' ATAGCCAGCTAACCCCTGC3 '

5'-del. clb2	5 'TATTTCCCTTCCAAGAAGCCTTTTATTGATTACCCCTCTCTCTTCATTGATCTTATAGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3 '
3'-del.clb2	5 'CATTTTATATGGACATTTATCGATTATCGTTTATAGATATTTAAGCATCTGCCCTCTTCCGCATCTGTGCGGTATTTACACCG3 '
5'test-del. clb2	5 'GTCCTATACCTCAAGAAGTA3 '
3' test-del. clb2	5 'CAACATCCGATACTGATGCT3 '
oligo 5'del. clb3	5 'TTCTGTCCTTCGCTTTAAACATAGAGATATTTTGTCTTTTATCATTGCTTATTATAACATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3 '
oligo 3' del. clb3	5 'TGCAAAAGACGGTAATGAATCCTTTTTCCTTGTGTGATGCCATGTCTCGAGCTGAGGCTTCGCATCTGTGCGGTATTTACACCG3 '
oligo 5' test CLB3	5 'TCTCAGTTACCCGCACTGCC3 '
oligo 3' test CLB3	5 'GCTTATGAGCCATTCATGGG3 '
oligo 5' del. clb4	5 'TGGGAAACTGCTTACTATACCGGATACTAGGCTGCCCTGATCAACAAGGAAATTGACAGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3 '
oligo 3' del. clb4	5 'TAAATGAAATATGATCCTTCCGAAACAAAACCTGAAGCAAATGGTGTTAAGATGAGTAAGCGCATCTGTGCGGTATTTACACCG3 '
oligo 5' test CLB4	5 'AATATACGCAGCGGCCTTGG3 '
oligo 3' test CLB4	5 'TGCGAATGCCGCTTACCTGG3 '
5'-del. yen1	5 'ATGAAATGACAGTTCTATTGCATTTTACCTACTTGTATATTCTGGATACTGCA CAAGAAACATCAGAGCAGATTGTACTGAGATGC3 '
3'-del. yen1	5 'TCCCTCGTTTTTCGGCGCATCAACTGTGGTGGCGGATTTTTTGACGCTGTGCCCGTTAACCGCATCTGTGCGGTATTTACACCG3 '
5'-test-del. yen1	5 'GGCATTGAACACTGGCTGTT3 '
3'-test-del. yen1	5 'TTACAATCCACTATACGGTC3 '
5'-del. sgs1/Kan	5 'AAAAATACAGATTATTGTTGTATATATTTAAAAAATCATACACGTACACACAA GGCGGTACAGCTGAAGCTTCGTACGC3 '
3'-del. sgs1/Kan	5 'AAGAATGCTTGGCGAATGGTGTCGTAGTTATAAGTAACACTATTTATTTTCT ACTCTCATAGGCCACTAGTGGATCTG3 '
5' test del sgs1	5 'GCTTCTCTCCACATGTCC3 '
3' test del sgs1	5 'CTGAATGAGTACATACCC3 '
ADH-fw-2 (seq1)	5 'CGGCACCGCCTCGGACGGCG3 '
ADH-fw-3 (seq2)	5 'TTTGCGGCGCCGAAAAAACG3 '
ADH-fw-4 (seq3)	5 'AGGGAACCTTACACTTCTCC3 '
ADH-fw-5 (seq4)	5 'ATGATGGAAGACACTAAAGG3 '
pRS303-M13ori-fw (seq10)	5 'AAACTTGATTAGGGTGATGG3 '
GALp1-10 fw1 (seq1)	5 'GGTAATTAATCAGCGAAGCG3 '
CDC5 fw1 (seq2)	5 'GCTGTTTCCAAATTAAGGACG3 '
CDC5 fw2 (seq3)	5 'TGTTGATTGGTAAGCCACCC3 '
CDC5 fw3 (seq4)	5 'AACGATTTGGCTCGTGAAGC3 '
CDC5 re1 (seq5)	5 'ATACTCGGCTCAAATTTGCC3 '
CDC5 re2 (seq6)	5 'ACCTGAGAAAGCAACCTGACC3 '

Tabla M3. Oligonucleótidos empleados en esta tesis para la construcción y comprobación de cepas de levaduras.

NOMBRE	SECUENCIA
3'FL-1	5' GATCACAGTGAGTACCGG3 '
3'FL-2	5' ACTGGCCGTCGTTTGTACTCACTGTGATC3 '
3'FL-3	5' AACGACGGCCAGT3 '
RF-1	5' GACGCTGCCGAATTCTGGCGTTAGGAGATACCGATAAGCTTCGGCTTAAG3 '
RF-2	5' ATCGATGTCTCTAGACAGCACGAGCCCTAACGCCAGAATTCGGCAGCGTC3 '
RF-3	5' CTTAAGCCGAAGCTTATCGGTATCT3 '
RF-4	5' GCTCGTGCTGTCTAGAGACATCGAT3 '
X0-1	5' ACGCTGCCGAATTCTACCACTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCCC3 '
X0-2A	5' GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCC3 '
X0-2B	5' ATCTGTTGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT3 '
X0-3	5' ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATCATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG3 '
X0-4	5' CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT3 '

Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados para formar las estructuras empleadas en los ensayos de actividad nucleasa llevados a cabo en esta tesis.

1.5. Medios de cultivo

Las células de levadura se crecieron de forma habitual en medio rico YP (extracto de levadura 1%, Becton Dickinson; bacto peptona 2%, Becton Dickinson) suplementado con glucosa al 2% (medio YPD). En los experimentos de inducción con el promotor *GAL1,10* se suplementó el medio YP con rafinosa al 2%, glucosa al 0,1% o galactosa al 2%. Para el medio sólido se añadió agar al 2% (Becton Dickinson). Cuando fue necesario, las células de levadura se crecieron en medio mínimo (YNB sin aminoácidos 0,67%, Becton Dickinson) suplementado con glucosa (Merck) al 2% y los aminoácidos requeridos (Sigma-Aldrich), a las siguientes concentraciones: adenina, uracilo, L-triptófano, y L-histidina a 0,04 mg/ml y L-leucina a 0,08 mg/ml. Para el medio sólido se añadió agar al 2% (Becton Dickinson).

La esporulación de diploides se llevó a cabo en medio rico de esporulación (RSM) (extracto de levadura 0,25%, acetato potásico CH₃COOK 0,15 M, D-glucosa 0,1%, agar 2% y H₂O), suplementado con una solución con los requerimientos auxotróficos, a una concentración final del 2,5% (solución stock: adenina 0,4%, uracilo 0,4%, L-histidina 0,2%, L-leucina 0,2%, L-lisina 0,2%, L-triptófano 0,2%, L-tirosina 0,08%, L-fenilalanina 1%, L-metionina 0,2% y L-arginina 0,2%; todos de Sigma-Aldrich).

Las selecciones con antibiótico se realizaron con geneticina 200 µg/ml (Gibco) o nourseotricina 100 µg/ml (Werner Bioagents).

E. coli se creció en medio LB (bacto-triptona 1%, Difco; extracto de levadura 0,5%, Difco; NaCl 1%, Merck). Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar al 2%. La selección con antibiótico se realizó suplementando el medio con ampicilina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich).

1.6. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis, así como su procedencia y diluciones de uso, se recogen en la Tabla M5.

NOMBRE	TIPO	ESPECIE	DILUCIÓN DE USO	ORIGEN
12CA5 (anti-HA)	Monoclonal	Ratón	1/1000	CBMSO
9E10 (anti-Myc)	Monoclonal	Ratón	1/1000	Cancer Research UK
Anti-Cdc5 (sc-6733)	Policlonal	Cabra	1/1000 o 1/3000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFP	Monoclonal	Ratón	1/400	Roche
PAP	Policlonal	Conejo	1/1000	Sigma-Aldrich

Tabla M5. Anticuerpos primarios empleados en esta tesis.

Los anticuerpos primarios de ratón se hibridaron con un anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina G de ratón acoplado a HRP (peroxidasa de rábano, Vector Laboratories), a una dilución 1:10000. El anticuerpo anti-Cdc5 se hibridó con un anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina G de cabra acoplado a HRP (peroxidasa de rábano, Santa Cruz Laboratories), a una dilución 1:5000.

1.7. Reactivos y enzimas

El metil metanosulfonato (MMS), la hidroxurea (HU), el cisplatino, la 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) y el nocodazol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El factor α fue proporcionado por el servicio de síntesis de péptidos del CBMSO.

Para el aislamiento de DNA plasmídico, la purificación de productos de PCR o la extracción de DNA a partir de bandas de geles de agarosa, se utilizaron los kits “Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system” y “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega. Las enzimas de restricción fueron suministradas por Roche, New England Biolabs (NEB) o Fermentas. Para la amplificación de fragmentos de DNA por PCR se emplearon las DNA polimerasas Vent (NEB), Ex Taq (Takara) y Go Taq (Promega). En los ensayos fosfatasa se empleó la fosfatasa *Lambda* (New England Biolabs).

La RNasa A, la pepsina, la β -glucuronidasa y la liticasa se adquirieron en Sigma-Aldrich. La proteinasa K y la enzima Klenow fueron proporcionadas por Roche. La zimoliasa-20T fue suministrada por Seikagaku.

En los geles de electroforesis para el análisis rutinario de fragmentos de DNA se empleó agarosa al 1% (Pronadisa).

Las soluciones de acrilamida 40%, bis-acrilamida 2%, acrilamida:bis-acilamida 37,5:1 40% y acrilamida:bis-acrilamida 19:1 40% fueron suministradas por Bio-Rad. Los marcadores de peso molecular de proteínas por NEB. Las membranas para unión de DNA (Hybond XL) o proteínas (Hybond ECL o Hybond-P), así como las columnas de Sefarosa G50, se obtuvieron de GE Healthcare.

El resto de sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos se obtuvieron de Merck, Sigma-Aldrich o PRS-Panreac.

2. MÉTODOS

2.1. Cultivo y transformación de *E. coli*

La bacteria *E. coli* se creció rutinariamente a 37°C, en medio LB líquido o sólido, suplementado con ampicilina 100 μ g/ml para el mantenimiento de los plásmidos de interés.

Para la transformación de *E. coli* se siguió el protocolo de Hanahan (1983), descrito a continuación: las células competentes (obtenidas del servicio de fermentación del CBMSO) se mezclan con el DNA y se mantienen en hielo durante 15 min. A continuación, se someten a un choque térmico a 42°C durante 90 s, tras lo cual se enfrían en hielo, se resuspenden en 4 volúmenes de LB y se incuban a 37°C durante 45 min para permitir la expresión del gen de resistencia al antibiótico que porta el plásmido introducido. Finalmente, las células se recogen, se plaquean en medio selectivo (LB con ampicilina) y se incuban a 37°C durante la noche.

2.2. Cultivos celulares de *S. cerevisiae* y sincronización en el ciclo celular

Las células de levadura se crecieron de forma habitual a 30°C hasta fase exponencial. En los experimentos de inactivación o degradación de proteínas *in vivo* en mutantes condicionales, las células de levadura se crecieron a temperatura permisiva (24°C) o restrictiva (37°C o 38°C, según la cepa empleada).

Para la obtención de cultivos sincrónicos en la fase G1 del ciclo celular se utilizó la feromona factor α (5-10 μ g/ml). Para sincronizar las células en fase S temprana se

usó hidroxihurea (HU) a 200 mM. Para bloquear las células en G2/M se utilizó nocodazol a 2-5 µg/ml.

El crecimiento y sincronización de las células se monitorizó siempre por observación y recuento del número de células al microscopio óptico en cámaras de Neubauer.

2.3. Construcción de cepas de *S. cerevisiae*

Los mutantes de delección se obtuvieron por sustitución génica. Para ello, se transformó la cepa correspondiente con un producto de PCR portador del gen marcador de selección, amplificado a partir de los plásmidos indicados en la Tabla M2 con oligonucleótidos que portaban secuencias idénticas a las regiones flanqueantes del gen a deleccionar (Tabla M3). En cada caso se delecionó la fase de lectura abierta (ORF) completa del gen. Se utilizó la misma estrategia para el etiquetado de proteínas o la sustitución de promotores: transformación de la cepa correspondiente con un producto de PCR con el fragmento de DNA de interés, flanqueado por las secuencias entre las que debe producirse la integración en el cromosoma. Las cepas portadoras de la versión no fosforilable de *Mms4* (YMG11-14), así como la que contiene una copia del gen *CDC5* bajo el control del promotor *GAL 1,10* (YMG24), se construyeron por integración de un plásmido linealizado en el que previamente se había clonado el gen de interés. En las cepas *mms4-np* la integración del alelo mutante se llevó a cabo en el locus del gen *MMS4*, previamente deleccionado. En la cepa YMG24, la integración de la copia extra de *CDC5* se realizó en el locus *ura3-1*. La construcción que contiene el mutante *mms4-np* se obtuvo de GeneArt.

Para la transformación de levaduras con el DNA de interés, se utilizó el método de transformación de Schiestl y Gietz (1989), modificado posteriormente por Gietz *et al* (1992). En este método de transformación, se parte de 10^8 células de levadura en fase exponencial, crecidas en medio rico (YPD). Tras la centrifugación de las muestras, las células se resuspenden en 50 µl de acetato de litio [(AcLi)/TE 100 mM, pH 7,5 (TE: Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM)], se mezclan con 5 µl de DNA de espermatozoide de salmón (10 mg/ml), 5-10 µl de DNA (1-2 µg) y 300 µl de AcLi/PEG (100 mM de AcLi pH 7.5, TE y 40% PEG 4000), y se incuban en agitación a 30°C durante 30 min. A continuación, se añade DMSO al 10% y se realiza un choque térmico de 15 min a 42°C, seguido de una incubación de 2 min en hielo. A continuación, las células se recogen, se resuspenden en TE y se siembran en placas con medio de selección apropiado para el crecimiento de las células transformantes. En el caso de usar genética o nourseotricina como marcadores de selección, las células se

resuspenden en 1 ml de YPD previamente a su siembra y se mantienen en agitación a 30°C durante 2,5-4 h, para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos.

Algunas de las cepas se obtuvieron por el cruce de dos estirpes haploides de tipo sexual opuesto (*MATa* y *MATα*) con los caracteres a combinar, la esporulación del diploide obtenido y la posterior selección de las esporas. Para la obtención de los diploides se mezclan células de las dos estirpes a cruzar en una placa de medio rico (YPD) y se incuban a 24°C durante toda la noche. Se aíslan colonias y cuando es posible los diploides se seleccionan por marcadores. Cuando no puede realizarse esta selección por marcadores, los posibles diploides se identifican tras observación microscópica, eligiendo las colonias con las células de mayor tamaño. Los potenciales diploides se pasan a medio RSM y tras 2-3 días de incubación a 30°C se observa su esporulación al microscopio. Las esporas se separan mediante disección de tétradas. Para ello, las ascas se tratan durante 15 min con zimoliasa para debilitar la membrana que las rodea. A continuación, se pone una gota de la suspensión celular en una placa de YPD y con un micromanipulador se diseccionan las tétradas y se aíslan las cuatro esporas, las cuales se disponen en posiciones conocidas de una placa, donde se dejan germinar a 30°C durante 2-3 días. A continuación, se replica esta placa en medio de selección apropiado, lo que permite observar la correcta segregación de los marcadores y la posterior selección de los haploides de interés.

Todas las cepas construidas se comprobaron por PCR, analizando la correcta inserción del DNA de interés en el *locus* deseado. Para ello se utilizaron parejas de oligonucleótidos que hibridaban en zonas internas del fragmento insertado y en regiones del genoma que lo flanquean. En las cepas portadoras de la versión no fosforilable de *Mms4* (YMG11-14) se secuenció el fragmento de DNA insertado que contenía el gen mutado y se analizó el número de copias del mismo. Para esto último se extrajo el DNA genómico de dichas cepas, se digirió con enzimas de restricción y se analizó el patrón de restricción mediante *Southern blot*. En las cepas en las que la proteína de interés estaba etiquetada, se comprobó por inmunoblot la correcta expresión de la proteína de fusión. Cuando fue posible, se comprobó además el fenotipo de las cepas construidas: morfología celular, sensibilidad a distintos compuestos o a temperatura, etc.

2.4. Citometría de flujo

El seguimiento de la progresión en el ciclo celular se llevó a cabo mediante el análisis del contenido de DNA de las células por citometría de flujo. Para ello se

empleó el método descrito por Labib *et al* (1999), que se describe a continuación. Se toman muestras de 0,5-1 ml de cultivo, se centrifugan y las células se fijan en etanol 70% y se conservan a 4°C. Para su análisis por citometría de flujo, se transfieren 50-200 µl de las células fijadas en etanol a 3 ml de citrato sódico 50 mM, para su rehidratación, y se centrifugan a 3000 rpm durante 3 min. A continuación, se resuspenden en 0,5 ml de citrato sódico 50 mM con RNasa A 0,1 mg/ml y se incuban a 37°C durante 2-4 h. Tras ello, se centrifugan de nuevo a 3000 rpm durante 3 min y se incuban durante 30 min a 37°C en una solución de HCl 50 mM con 5 mg/ml de pepsina. Finalmente, las células se centrifugan de nuevo 3 min a 3000 rpm y se resuspenden en 1 ml de citrato sódico 50 mM con ioduro de propidio 2 µg/ml (Sigma-Aldrich), para la tinción del DNA. Antes de su paso por el citómetro, las muestras se sonicán para deshacer cualquier agregado. Para el análisis de las muestras se empleó un citómetro FACScalibur (BD Biosciences), utilizando el programa CellQuestPro.

2.5. Ensayos de sensibilidad al tratamiento con MMS

La sensibilidad al tratamiento crónico con los agentes genotóxicos MMS, HU, cisplatino y 4NQO se estudió mediante ensayos de crecimiento en placas de medio rico en presencia de dichos agentes a distintas concentraciones (“ensayo de gotas”). El crecimiento en placa se realizó a partir de diluciones seriadas (1/10) de cultivos creciendo exponencialmente a una concentración de 1×10^7 céls/ml. Se plaquearon 3,5 µl de cada dilución. Las placas se incubaron a 30°C durante 48-72 h.

2.6. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

2.6.1 Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae*

Para la extracción del DNA genómico se utilizó un método basado en el descrito por Rose *et al* (1989), que se describe a continuación. Se recogen unas 10^8 células en fase exponencial de crecimiento, que se centrifugan durante 3 min a 3000 rpm. El precipitado celular se resuspende en 200 µl de solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, SDS 0,1%), y se transfiere a un tubo de fondo cónico de 1,5 ml con aproximadamente 300 µl de perlas de vidrio de 0,4 mm (Thomas Scientific). Se añaden 200 µl de fenol: cloroformo (1:1) y la suspensión se agita en el vórtex durante 1 min. A continuación, se añaden 200 µl de TE y se mezcla unos segundos en el vórtex. Se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min y se recoge la fase superior, que se mezcla con un volumen de cloroformo para eliminar restos de fenol. De nuevo se centrifuga durante 1 min y la fase superior se transfiere a otro tubo y se añaden dos

volúmenes de etanol 100% para precipitar el DNA. Se mezcla por inversión y se centrifuga 3 min a 14000 rpm. Tras ello, se descarta el sobrenadante y el precipitado obtenido se lava con etanol 70%, se seca, se resuspende en TE con RNasa A 100 µg/ml y se incuba a 37°C durante al menos 30 min.

2.6.2 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se utilizó el kit “Minipreps DNA purification system” (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.6.3. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de DNA por PCR se emplearon diferentes DNA polimerasas (Apdo. 1.7) y sus tampones correspondientes, según las indicaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes variables (20-100 µl), utilizando oligonucleótidos suministrados por Invitrogen y dNTPs adquiridos en Biotools o Roche. Como molde se emplearon cantidades variables de DNA plasmídico o genómico, o una pequeña cantidad de biomasa celular de *S. cerevisiae* tomada directamente de una placa. En este último caso, se rompieron las células calentándolas durante 10 min a 95°C como paso previo a la reacción de amplificación, que se llevó a cabo con la enzima GoTaq. La duración de los ciclos de extensión y la temperatura de apareamiento fueron variables, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y de la Tm de los oligonucleótidos.

Cuando los fragmentos amplificados se utilizaron para transformar *S. cerevisiae*, fueron purificados previamente con un kit de Promega (Apdo. 1.7) siguiendo las instrucciones del fabricante, directamente después de la PCR o a partir de una banda de agarosa obtenida tras separar el fragmento mediante electroforesis.

2.6.4. Digestión enzimática de DNA

La digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción se realizó también por procedimientos estándar, de acuerdo a las instrucciones ofrecidas por los fabricantes. En todos los casos, cuando fue necesario, los productos obtenidos se purificaron utilizando el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.6.5. Electroforesis de DNA

El análisis de las moléculas de DNA se llevó a cabo de forma rutinaria mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto permitió separar fragmentos de distintos tamaños y estimar la calidad y cantidad del DNA a estudio. También permitió su posterior extracción. Se utilizaron geles de agarosa de porcentajes variables (0,7-3%), preparados en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El DNA fue visualizado mediante exposición a luz ultravioleta.

2.6.6. Transferencia de DNA a membranas

Para la transferencia de DNA a membranas desde geles de agarosa y su posterior hibridación con sondas específicas (*Southern blot*), estos se trataron, tras la electroforesis, con HCl 0,25 M a temperatura ambiente durante 15 min. Tras ello, se incubaron con NaOH 0,4 N en agitación suave durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, el DNA se transfirió por capilaridad a membranas de nailon cargadas positivamente (Hybond-XL, GE-Healthcare) durante aproximadamente 16 h, utilizando como solución de transferencia NaOH 0,4 N. Después de la transferencia, las membranas se incubaron brevemente en tampón sodio-fosfato 40 mM (a partir de un stock 0,5 M: Na₂HPO₄ 400 mM, NaH₂PO₄ 100 mM), en agitación suave, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

2.7. Hibridación de DNA con sondas radiactivas

2.7.1. Marcaje de sondas de DNA

Las sondas empleadas para la detección de secuencias génicas específicas mediante *Southern blot* se amplificaron por PCR desde DNA genómico utilizando la DNA polimerasa Vent. En cada reacción se marcaron 50 ng de DNA desnaturalizado (hirviéndolo durante 10 min) con 50 µCi de [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, Pelkin Elmer), mediante la técnica de inserción de nucleótidos al azar, utilizando el kit de marcaje de Roche "*Random Primed DNA Labelling Kit*". El marcaje se llevó a cabo a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 µl de EDTA 0,2 M y los nucleótidos no incorporados se retiraron pasando el total de la reacción por microcolumnas de exclusión de Sephadex G-50 (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7.2. Hibridación de DNA

Las membranas se prehibridaron durante 1 h a 65°C en 15 ml de la solución de hibridación (Na_2HPO_4 400 mM, NaH_2PO_4 100 mM, EDTA 1 mM, SDS 7%) junto con DNA de esperma de salmón (100 $\mu\text{g/ml}$) desnaturalizado para bloquear las uniones inespecíficas de las sondas. A continuación, se añadieron las sondas marcadas y desnaturalizadas (hirviéndolas 10 min) y se incubaron en agitación suave a 65°C durante toda la noche. Tras la hibridación se realizaron tres lavados de 30 min a 65°C con la solución: tampón sodio-fosfato 40 mM (stock 0,5 M: Na_2HPO_4 400 mM, NaH_2PO_4 100 mM), EDTA 1 mM y SDS 1%. Tras ello, las membranas se expusieron en pantallas sensibles a la radiación (Imaging Plate, Fujifilm), que se leyeron en un escáner Fujifilm Bas 1500 o en películas autorradiográficas (Agfa) con pantallas intensificadoras de la señal (Hyperscreen, Amersham).

2.8. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó siguiendo básicamente el protocolo de Foiani *et al* (1994), según se describe a continuación. Se parte de un cultivo en fase exponencial de crecimiento y se recogen por centrifugación células a partir de 5-10 ml de cultivo. Tras lavarlas con agua, el precipitado se resuspende en 300 μl de ácido tricloroacético al 20%, se transfiere a un tubo de fondo cónico de 1,5 ml con el mismo volumen de perlas de vidrio y se agita en el vórtex durante 1 min. La suspensión obtenida se transfiere a un nuevo tubo, mientras que las perlas se lavan con 200 μl de TCA 5% y los sobrenadantes se añaden al extracto recogido previamente. Tras ello, el extracto se centrifuga durante 10 min a 3000 rpm, se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 200 μl de tampón Laemmli (Tris 60 mM pH 6,9, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,004%). A continuación, se añaden 50 μl de Tris base 1 M para neutralizar el pH. Las muestras se hierven durante 3 min y se clarifican por centrifugación (10 min a 3000 rpm). Los sobrenadantes se transfieren a tubos nuevos y se guardan a -20°C. Todo el proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente.

2.9. Electroforesis de proteínas e inmunoblot

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 7,5 ó 10%. Las electroforesis se realizaron de manera habitual a 150 V, durante 1,5-2,5 h, en tampón TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS, 0,1% pH 8.3; Bio-Rad). A continuación, los geles se equilibraron en tampón de

transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 [Bio-Rad], SDS 0,0375%, metanol 20%) durante 10 min. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare) utilizando una unidad de transferencia semi-seca (GE-Healthcare), durante 30-60 min (dependiendo de la proteína), a 15 V. Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de Ponceau S al 0,2% en TCA 3% y se escanearon para usar estas tinciones como control de carga y transferencia.

Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se bloquearon en una solución de leche desnatada en polvo (Sveltese, Nestlé) al 5% en TBST (TBS: NaCl 136 mM, KCl 2,68 mM, Tris Base 24 mM, ajustado a pH 8,0, suplementado con Tween-20 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. A continuación, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario (en una solución de leche al 5% en TBST), se lavaron 3 veces durante 10 min con TBST, se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario apropiado (en una solución de leche al 5% en TBST) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) y se lavaron 3 veces durante 10 min con TBST. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL prime, GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante, tras lo cual las membranas se expusieron en autorradiografías (Agfa). Para la cuantificación de las bandas de proteínas se utilizó un densitómetro GS-800 y el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

2.10. Ensayos fosfatasa

Para llevar a cabo los ensayos fosfatasa se purificó previamente por inmutioafinidad la proteína Mms4 etiquetada con HA, a partir de 10⁸ células. Las células se lavaron con PBS, se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en un volumen de 700 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 40 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol 4%, NP40 0,1%, cóctel completo de inhibidores de proteasas de Roche, EDTA 8 mM, EGTA 8 mM, benzamidina 2 mM, pepstatina A 2 µg/ml, NaF 5 mM, Na₄P₂O₇ 5 mM). Tras ello, se transfirió a un tubo de fondo cónico de 1,5 ml con el mismo volumen de perlas de vidrio y se agitó en el vórtex durante 6 periodos de 30 s. A continuación, el lisado se sometió a sonicación suave durante dos periodos de 15 s y se clarificó por centrifugación. El sobrenadante se incubó con el anticuerpo 12CA5 durante 180 min a 4°C, seguido de incubación durante 60 min con 15 µl de proteína G-sepharose 4 fast flow (GE Healthcare), previamente equilibrada en tampón de lisis. A continuación, las perlas de sefarosa se centrifugaron y se lavaron dos veces con 5 volúmenes de tampón PMP (New England Biolabs). Se eliminó el sobrenadante y las proteínas

unidas a la matriz de sefarosa se usaron para el ensayo fosfatasa. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C durante 30 min con agitación suave, usando 8 U/μl de fosfatasa λ (New England Biolabs) en tampón PMP suplementado con MnCl₂ 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 20 mM y glicerofosfato de sodio 2 mM. Como control, se realizaron también reacciones en presencia de inhibidores de fosfatasa, añadiendo en los ensayos Na₃VO₄ 50 mM, NaF 250 mM y glicerofosfato de sodio 10 mM. Las reacciones se pararon mediante la adición de tampón Laemmli (Apdo. 2.8) y el resultado se analizó por inmunoblot.

2.11. Ensayos de actividad nucleasa

Los oligonucleótidos usados para construir las estructuras sintéticas de DNA utilizadas en los ensayos de actividad nucleasa se relacionan en la Tabla M4. Para la obtención de una estructura 3'-*FLAP* (3'-FL), se emplearon los oligonucleótidos 3'FL-1, 3'FL-2 y 3'FL-3 (Figuras R14 y R16) o RF1, RF2 y RF4 (Figuras R21, R23 y R25). Para la formación de una horquilla de replicación modelo (RF), se utilizaron los oligonucleótidos RF-1, RF-2, RF-3 y RF-4. Para la construcción de una unión de Holliday con mella (nHJ), se emplearon los oligonucleótidos X0-1, X0-2A, X0-2B, X0-3 y X0-4. Para utilizar estas estructuras como sustratos en los ensayos de actividad nucleasa, se marcaron radioactivamente los oligonucleótidos 3'FL-1, RF-1 y X0-1 en el extremo 5', usando [γ-³²P]-ATP (Perkin Elmer) y la polinucleótido quinasa T4 (New England Biolabs), y después se hibridaron con un exceso de sus oligonucleótidos complementarios. La hibridación se llevó a cabo calentando las moléculas de DNA a 80°C durante 10 min en tampón NaCl 200 mM y Tris-HCl 60 mM pH 7,5, seguido de un enfriamiento lento hasta temperatura ambiente.

La purificación por inmunoadinidad y los ensayos de actividad nucleasa se llevaron a cabo siguiendo básicamente el protocolo de Rass y West (2006). Las versiones etiquetadas de Mms4 se purificaron por inmunoadinidad a partir de 7,5 x 10⁸ células. Las células se lavaron con PBS a 4°C y se resuspendieron en 800 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5; AcK 100 mM; glicerol 4%, NP40 0,1%; DTT 5 mM; NaF 5 mM; Na₄P₂O₇ 5 mM, cóctel completo de inhibidores de proteasas de Roche 2X), en frío. Se añadieron aproximadamente 750 μl de perlas de vidrio a esta suspensión y las células se lisaron mediante 6 pulsos de 30 s en el vórtex, a máxima velocidad, con intervalos de 30 s en hielo. A continuación, las muestras se sonicaron mediante tres pulsos suaves de 10 s, tras lo que se centrifugaron a 14000 r.p.m durante 40 min a 4°C. Para Mms4-TAP, el sobrenadante se incubó durante 90 min a 4°C con 15 μl de IgG Sepharose 6 fast flow (GE Healthcare). Para HA-Mms4, el

sobrenadante se incubó durante 180 min a 4°C con anticuerpo 12CA5, seguido de 60 min de incubación con 15 µl de Proteína G-Sefarosa 4 fast flow (GE Healthcare) o Proteína A-Sefarosa (Sigma-Aldrich). Las proteínas unidas a sefarosa se centrifugaron, se lavaron intensivamente y se usaron directamente para las reacciones. Las mezclas de reacción (12,5 µl) contenían 20 fmol de DNA sustrato marcado en NaCl 100 mM (NaCl 200 mM para nHJs), Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 3mM (5 mM para nHJs), 250-500 ng poli [dl-dC] y DTT 0,2 mM, además de la proteína Mms4 etiquetada inmunopurificada. Las reacciones se incubaron durante 1 h a 30°C. Para los ensayos en los que se utilizaron RFs y 3'-FLs como sustratos, las reacciones se interrumpieron con tampón de parada desnaturizante (formamida 19%, EDTA 4 mM, xileno-cianol 0,01% y bromofenol 0,01%). En los ensayos en los que se emplearon nHJs, las reacciones se pararon con EDTA 50 mM, SDS 0,8% y proteínasa K (2 mg/ml), seguido de incubación durante 30 min a 30°C, tras lo que se añadió a las muestras tampón de carga (glicerol 10%, EDTA 4 mM, xileno-cianol 0,01% y bromofenol 0,01%). Los productos marcados con P³² se analizaron mediante electroforesis en geles neutros de poliacrilamida (TBE-PAGE) al 10%, (para las nHJs), o por electroforesis en geles de acrilamida desnaturizantes al 10% (para RFs) o 20% (para 3'-FLs) con urea 7 M.

2.12. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas

Las proteínas se purificaron por inmutioafinidad, según lo descrito en el Apartado 2.10. En todos los casos se utilizó el anticuerpo 12CA5 para incubar los sobrenadantes obtenidos tras la lisis y sonicación de las células, así como Proteína A-Sefarosa. Las proteínas unidas a la sefarosa se lavaron 5 veces con tampón de lisis frío (Apartado 2.10.). Posteriormente, se añadieron 100 µl de tampón Laemmli a las muestras y se hirvieron durante 3 min. La co-inmunoprecipitación de las proteínas a estudio se analizó mediante inmunoblot, utilizando los anticuerpos que reconocían a cada una de ellas (12CA5 y anti-GFP).

RESULTADOS

1. Mms4 se modifica durante el ciclo celular

Para estudiar la posible regulación del complejo endonucleasa Mus81-Mms4, comenzamos analizando los niveles y posibles modificaciones de las subunidades Mus81 y Mms4 a lo largo del ciclo celular mitótico (Figura R1). Para ello construimos cepas en las que etiquetamos cada una de estas proteínas con el epítipo hemaglutinina (HA).

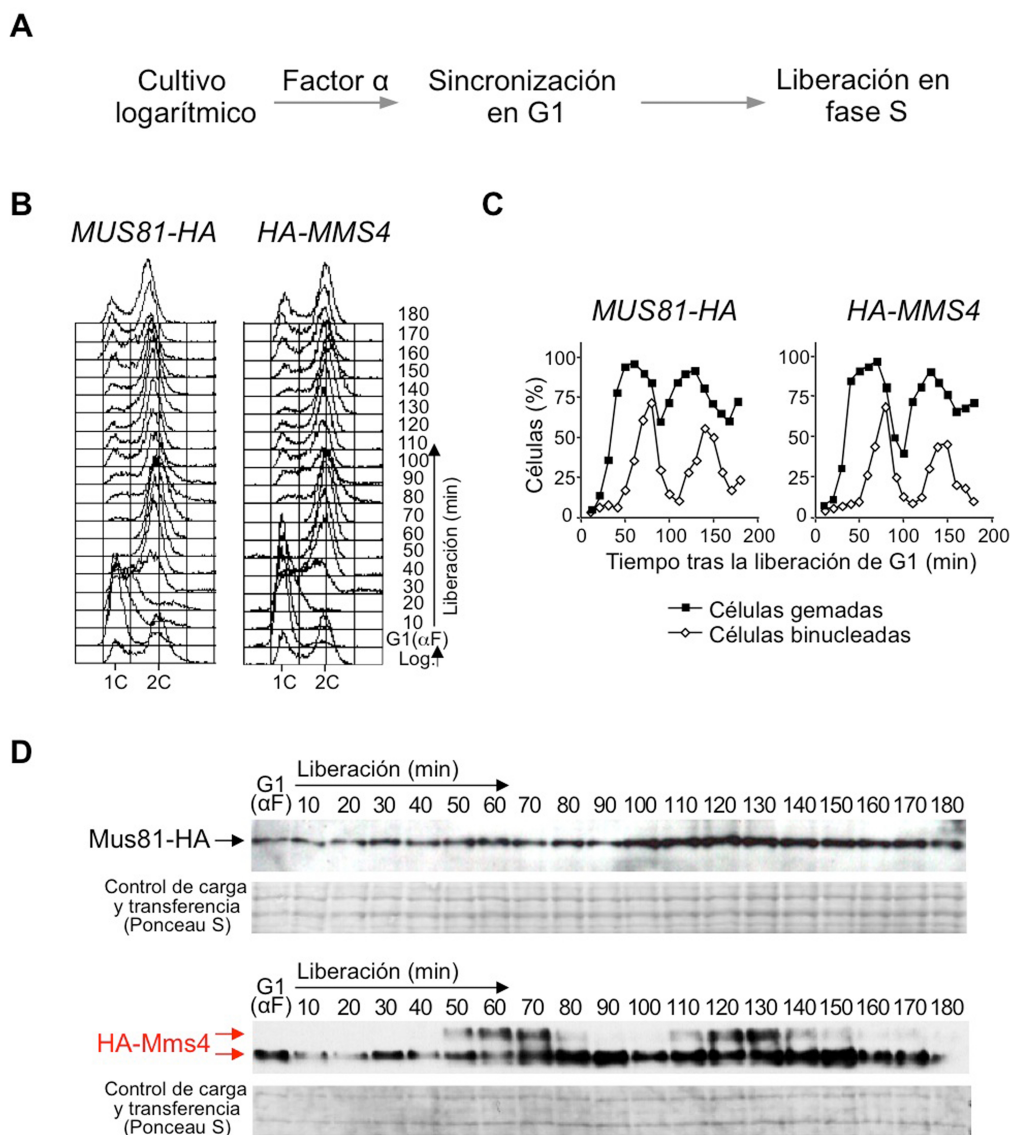


Figura R1. Mms4 se modifica a lo largo del ciclo celular. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *MUS81-HA* (cepa YMV20) y *HA-MMS4* (cepa YMV33) en la fase G1 con la feromona factor α y se liberaron posteriormente en la fase S, dejándolas ciclar durante aproximadamente dos ciclos celulares. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. (C) Representación gráfica del porcentaje de células gemadas y binucleadas en cada tiempo. (D) Análisis de las proteínas Mus81-HA y HA-Mms4 mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S.

En ambos casos se partió de cultivos logarítmicos que fueron sincronizados en G1 mediante la adición al medio de cultivo de la feromona factor α . A continuación, las células se liberaron en medio fresco y se les permitió progresar durante aproximadamente dos ciclos celulares (Figura R1A). La progresión en el ciclo celular se siguió mediante el análisis del contenido de DNA por citometría de flujo (Figura R1B), la estimación del índice de gemación y el porcentaje de células binucleadas (Figura R1C). A los tiempos indicados se recogieron células para la extracción de proteínas, que se analizaron por inmunoblot (Figura R1D). Este análisis reveló que Mus81, la subunidad catalítica del complejo, no presenta variaciones significativas de sus niveles durante el experimento, ni tampoco modificaciones detectables por cambios en la migración electroforética (Figura R1D, panel superior). Sin embargo, la subunidad no catalítica Mms4 muestra bandas de diferente migración electroforética cuya aparición depende de la progresión en el ciclo celular (Figura R1D, panel inferior). Así, en las fases G1 y S, se observa una única banda de Mms4 en el inmunoblot. Sin embargo, entre los 50 y los 70 min tras la liberación de las células del bloqueo en G1, Mms4 muestra al menos dos bandas con distinta migración en el gel. A partir de los 70 min, la banda de migración más lenta desaparece gradualmente hasta alcanzar niveles indetectables, y esta forma modificada de Mms4 se detecta claramente de nuevo en el segundo ciclo celular, entre los 110 y los 140 min tras la liberación del bloqueo en G1 (Figura R1D, panel inferior). Estos datos, junto a los mostrados en las figuras R1B y R1C, indican que Mms4 se modifica en un periodo de tiempo comprendido aproximadamente entre el final de la fase S y la entrada en mitosis.

2. Mms4 está modificada en células bloqueadas en G2/M

Para determinar con mayor precisión el momento del ciclo celular en el que la proteína Mms4 se modifica, analizamos si la modificación observada requería la progresión en la mitosis o, por el contrario, ocurría previamente a la segregación cromosómica (Figura R2). Para ello, se sincronizaron células *HA-MMS4* en la fase G1 con factor α y se liberaron a continuación en la fase S en medio fresco, tanto en ausencia como en presencia de nocodazol (Figura R2A). Este compuesto inhibe la polimerización de los microtúbulos, impidiendo la formación del huso mitótico, lo que causa el bloqueo de las células en la transición G2/M. El análisis del contenido de DNA a lo largo del experimento mediante citometría de flujo (Figura R2B), así como la estimación del índice de gemación y el porcentaje de células binucleadas (Figura R2C) indicaron que, en ambos cultivos, las células entraron y progresaron con normalidad en la fase S. En ausencia de nocodazol, las células continuaron progresando a lo largo

del ciclo celular. Sin embargo, en el medio con nocodazol, las células quedaron bloqueadas con un contenido de DNA 2C, permaneciendo gemadas y presentando un único núcleo sin dividir, lo que indicaba una parada en G2/M.

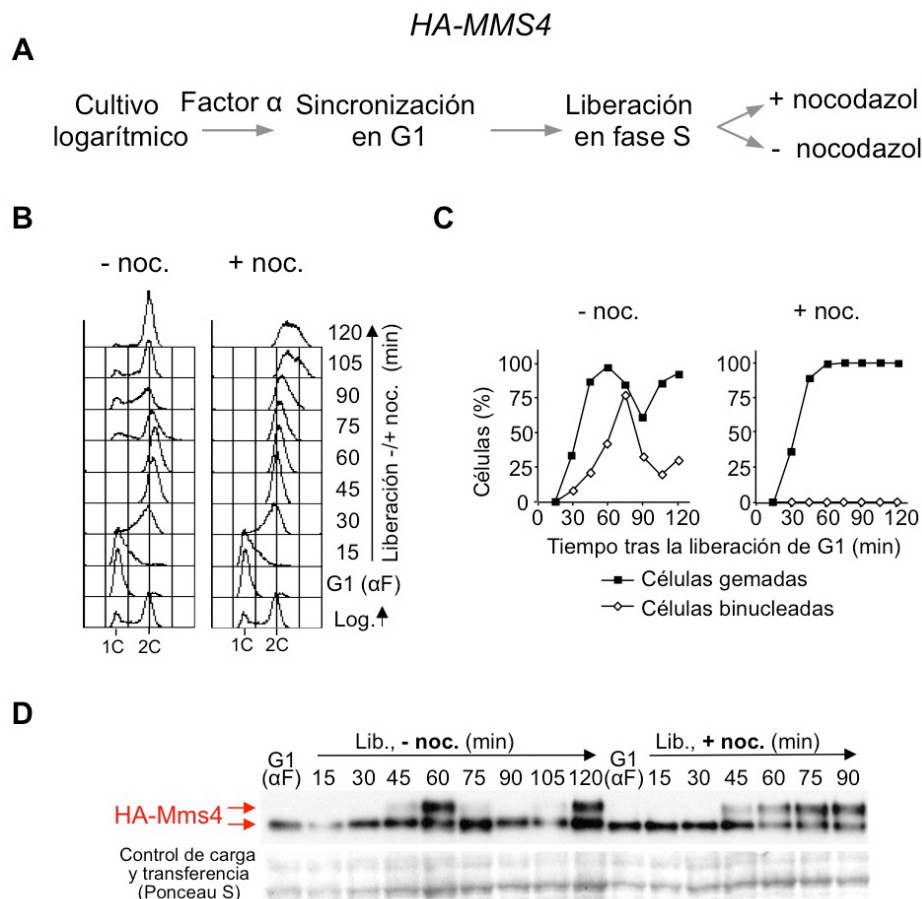


Figura R2. Mms4 está modificada en células bloqueadas en G2/M. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *HA-MMS4* (cepa YMV33) en la fase G1 con la feromona factor α y se liberaron posteriormente en la fase S, en ausencia y en presencia de nocodazol en el medio. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. (C) Representación gráfica del porcentaje de células gemadas y binucleadas en cada tiempo. (D) Análisis de la proteína HA-Mms4 mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S.

El análisis de la proteína Mms4 mediante inmunoblot (Figura R2D) mostró que, en ambos casos, Mms4 se modificaba a los 45-60 min tras la liberación del bloqueo en G1, momento en el que, según los datos obtenidos mediante citometría de flujo, las células presentaban un contenido de DNA 2C, tanto en presencia como en ausencia de nocodazol en el medio. En ausencia de esta droga, la modificación de Mms4 presentó un patrón temporal similar al mostrado en la figura R1D. En presencia de nocodazol, la modificación de Mms4 se mantuvo hasta el final del experimento como consecuencia del bloqueo en G2/M. Estos resultados indican que la modificación de

Mms4 encontrada, que depende de la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células, ocurre después de que al menos la mayor parte de la replicación cromosómica se haya completado, pero antes de que comience la segregación cromosómica.

3. La modificación de Mms4 se mantiene a lo largo de la mitosis

A continuación, dado que la forma modificada de Mms4 no está presente cuando las células pasan a un nuevo ciclo celular (Figuras R1 y R2), estudiamos si la modificación existente en G2/M se mantiene durante la mayor parte de la mitosis o desaparece antes de acabar esta fase del ciclo celular. Para ello, analizamos el patrón de modificación de Mms4 en el mutante condicional termosensible *cdc15-2*. *CDC15* codifica una proteína quinasa que forma parte de la ruta de salida de mitosis (*Mitosis Exit Network*; MEN) (Lee *et al*, 2001; Sullivan y Morgan, 2007), y las células *cdc15-2* quedan bloqueadas en anafase tardía/telofase a la temperatura restrictiva. Para llevar a cabo este estudio, se sincronizaron células *cdc15-2 HA-MMS4* en la fase G1 con factor α a la temperatura permisiva de 24°C. A continuación, el cultivo se dividió en dos: una parte se mantuvo en G1 a 24°C y la otra se mantuvo en G1, pero a la temperatura restrictiva (37°C), en ambos casos durante 60 min. Después, cada cultivo se liberó del bloqueo en G1 a 24°C o 37°C, respectivamente (Figura R3A). El análisis de la progresión en el ciclo celular por citometría de flujo (Figura 3B) indicó que, a la temperatura permisiva, las células completaron la replicación del DNA a los 60-75 min tras la liberación de G1, mientras que a la temperatura restrictiva (37°C) la compleción de la replicación del DNA fue más rápida, detectándose un contenido de DNA 2C en la mayoría de las células a partir de los 45 min. A la temperatura permisiva, las células continuaron su progresión en el ciclo celular, mientras que, a la temperatura restrictiva, debido a la inactivación de Cdc15 y su requerimiento para la progresión en mitosis, las células se bloquearon con un contenido de DNA 2C. El análisis de Mms4 mediante inmunoblot (Figura R3C) mostró que, a la temperatura permisiva (24°C), la modificación de Mms4 ocurría entre los 60 y los 105 min tras la liberación de G1, cuando las células habían alcanzado un contenido en DNA 2C. Cuando Cdc15 se inactivó (a la temperatura restrictiva), la banda de migración electroforética correspondiente a la forma modificada de Mms4 se detectó a partir de los 60 min tras la liberación de G1 y se mantuvo a lo largo del experimento, como consecuencia del bloqueo en anafase tardía/telofase (Figura R3C). Por lo tanto, puede concluirse que la modificación de Mms4 se mantiene durante, al menos, la mayor parte de la mitosis.

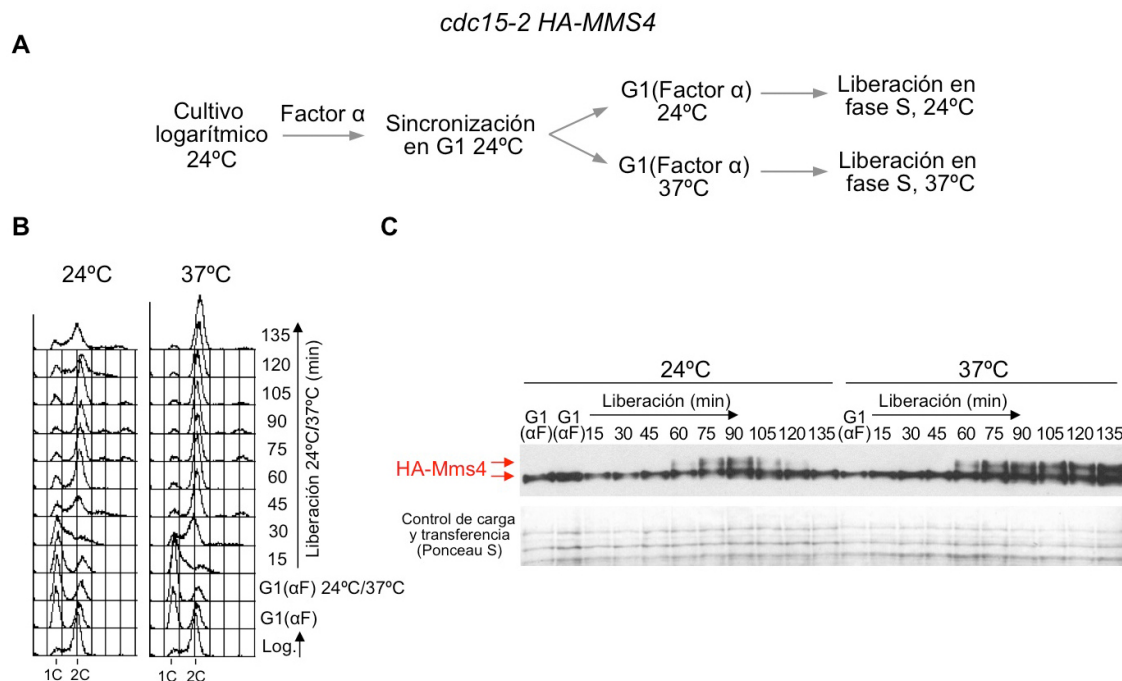


Figura R3. La modificación de Mms4 se mantiene a lo largo de la mitosis. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *cdc15-2 HA-MMS4* (cepa YMG49) en la fase G1 con la feromona factor α . A continuación, se dividió el cultivo en dos: uno de ellos se mantuvo en G1 a temperatura permisiva (24°C) y el otro a temperatura restrictiva (37°C), para inactivar Cdc15. Posteriormente ambos cultivos se liberaron en la fase S a 24°C y 37°C, respectivamente. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. (C) Análisis de la proteína HA-Mms4 mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S, como control de carga y transferencia.

4. La modificación de Mms4 dependiente de la progresión en el ciclo celular es una fosforilación

Tras determinar que la subunidad Mms4 se modifica durante un periodo concreto del ciclo celular, analizamos a continuación en qué consistía esta modificación postraduccion. Dado que estudios previos habían mostrado que tras la purificación de Mms4 se obtenía una proteína fosforilada (Ehmsen y Heyer, 2008), y teniendo en cuenta que la fosforilación de proteínas está asociada frecuentemente a un retraso en la movilidad electroforética, razonamos que la modificación de Mms4 observada podría ser una fosforilación. Para analizar esta hipótesis, se inmunoprecipitó Mms4 a partir de células *HA-MMS4* bloqueadas en G2/M con nocodazol y se trató posteriormente con fosfatasa λ (Figura R4A). Como se observa en el inmunoblot (Figura R4B), este tratamiento tuvo como resultado la eliminación de la forma modificada de Mms4. Además, este cambio en la migración electroforética se inhibía mediante la adición a la reacción de inhibidores de fosfatasa (Figura R4B).

Estos resultados muestran que la modificación de Mms4 dependiente de ciclo celular se corresponde con una fosforilación de la proteína.

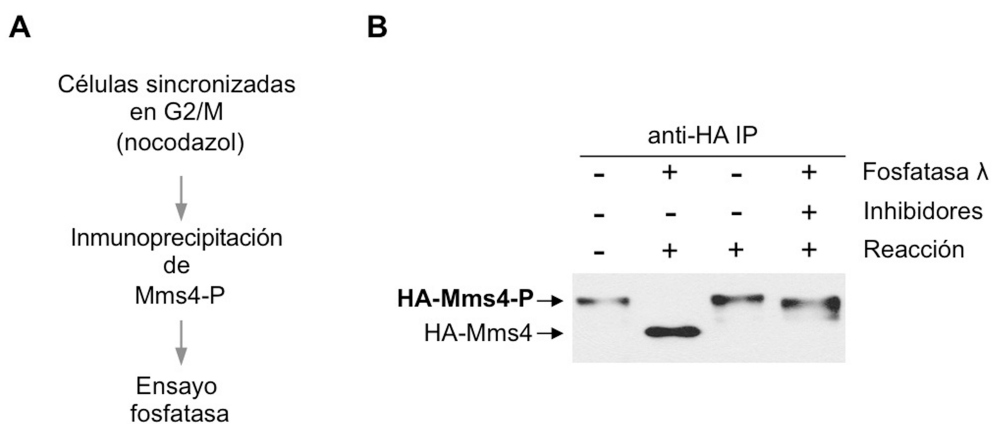


Figura R4. La modificación de Mms4 es una fosforilación. (A) Esquema del experimento. La proteína HA-Mms4 se inmunoprecipitó a partir de extractos de células sincronizadas en G2/M con nocodazol. (B) Ensayo fosfatasa. La proteína HA-Mms4 obtenida por inmunoprecipitación se incubó en ausencia o presencia de fosfatasa λ, así como con fosfatasa λ + inhibidores de fosfatasa. A continuación, HA-Mms4 se analizó mediante inmunoblot. La forma fosforilada de Mms4 se indica como HA-Mms4-P.

5. La fosforilación de Mms4 depende de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) Cdc28

La proteína Mms4 contiene tres sitios consenso completos (T/S-P-X-K/R) y otros tres sitios consenso mínimos (T/S-P) de fosforilación por quinasas dependientes de ciclina (CDK) (Figura R5). Además, Mms4 había sido identificada como una posible proteína diana de Cdk1 (Cdc28 en *S. cerevisiae*) (Ubersax *et al*, 2003). Era posible, por tanto, que Cdc28 fuera necesaria para la fosforilación de Mms4 dependiente de ciclo celular que habíamos encontrado. Para investigar esta posibilidad, y dado que Cdc28 es esencial, utilizamos un mutante condicional de *CDC28*, *cdc28-td*, en una cepa en la que se había situado además el gen *UBR1* bajo el control del promotor *GAL1,10*. En el mutante *cdc28-td* se añade una extensión a Cdc28 en el extremo N-terminal (el *degron* inducible por calor), que reduce la vida media de la proteína de fusión obtenida mediante su degradación a 37°C vía proteasoma (Dohmen *et al*, 1994). Además, la expresión de *UBR1* está controlada por el promotor *GAL1-10*, lo que permite generar niveles altos de Ubr1 que facilitan la degradación de la proteína de fusión termosensible (Labib *et al*, 2000).

Mms4

```

1  MSQIVDFVEDKDSRNDASIQIIDGPSNVEIIALSESMDQDECKRAHVSSA
51  EMIPSSSPQRKSVSNDVENVDLNSIELSAPFFQDISISKLDDFSTTVNSI
101 IDSSLRNENNAKGNACKLLDDLISDEWSADLESSGKKHNKSQYNLRDIAE
151 KGWVQSLKNPEPIAVDCEYKTQGIGKTNSDISDSPKSQIGAADILFDFPL
201 SPVKHENPTEEKHNSIANENSSPDNSLKPAGQONHGEGTSMARVYNKG
251 EDEQEHLPGKGRRTIALSRTLINSTKLPTVELNLSKFLDSSDSITTDVL
301 STPAKGSNIVRTGSQPIFSNANCFQEAKRSTLTAEDEPKCTKNTAREVSQ
351 LENYIAYGQYYTREDSSKNKIRHLLKENKNAFKRVNQIYRDNIKARSQMI
401 EFSPSLLQLFKKGDSDLQQQLAPAVVQSSYNDSPMLLRFLRKCDISIYDFS
451 NDFYYPCDPKIVEENVLILYYDAQEFFEQYTSQKKELYRKIRFFSKNGKH
501 VILILSDINKLKRAIFQLENEKYKARVEQRLSGTEEALRPRSKKSSQVGK
551 LGIKKFDLEQRLRFIDREWHVKIHTVNSHMEFINSLPNLVSLIGKQRMDF
601 AIRYMKYAHNLNVKSAQDSTETLKKTFHQIGRMPKANNVVSLSYPSFQSL
651 LEDIEKGRQLQSDNEGKYLMTAEVEKRLYKLFTCTDPNDTIE*

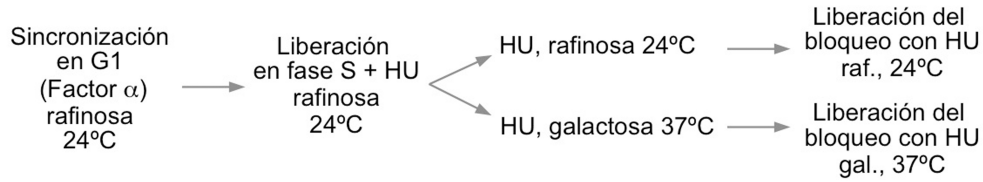
```

Figura R5. La proteína Mms4 presenta sitios consenso de fosforilación por CDK. Secuencia de aminoácidos de la proteína Mms4. Se resaltan en verde los sitios consenso completos [(S/T)-P-X-(K/R)] y mínimos [(S/T)-P] de fosforilación por CDK. Se indican subrayadas las serinas y treoninas potencialmente fosforilables por CDK.

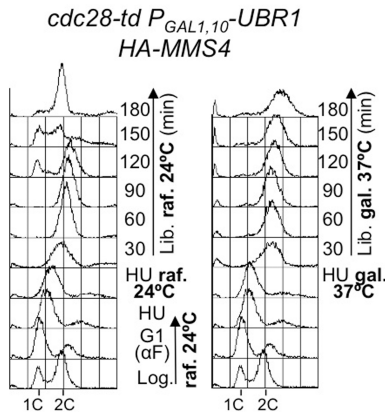
Para estudiar la posible implicación de Cdc28 en la fosforilación de Mms4 (Figura R6), se crecieron células *cdc28-td P_{GAL1-10}-UBR1 HA-MMS4* a 24°C en medio con rafinosa como fuente de carbono, se sincronizaron en G1 con factor α y se liberaron a continuación en medio con hidroxurea (HU), un inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa que causa una reducción significativa de los niveles de dNTPs. Cuando las células se liberan del bloqueo en G1 en presencia de HU, la replicación del DNA se inicia desde los orígenes de replicación tempranos y, debido a la bajada de los niveles de dNTPs, las horquillas de replicación se bloquean, causando una parada en la fase S temprana. Después de este punto, no se requiere nueva iniciación de la replicación para completar la fase S (Bousset y Diffley, 1998). Tras la liberación de G1 en presencia de HU a la temperatura permisiva, el cultivo se dividió en dos: una parte se mantuvo en condiciones permisivas (medio con rafinosa - promotor *GAL1-10* inactivo-, 24°C); la otra parte se incubó a 37°C y se indujo la expresión de *UBR1* mediante la adición al medio de galactosa, lo cual permitió la degradación de Cdc28. En ambos casos se mantuvo la presencia de HU durante 60 min, tras lo que las células se liberaron del bloqueo con esta droga, en condiciones tanto permisivas como restrictivas. Un esquema del experimento realizado se muestra en la Figura R6A. El análisis por citometría de flujo indicó que, después de la liberación del bloqueo con HU, en condiciones permisivas, las células completaron la replicación del DNA en aproximadamente 90 min y comenzaron un nuevo ciclo celular (Figura R6B). En condiciones restrictivas, las células también progresaron y completaron la fase S. Sin embargo, como consecuencia de la inactivación de Cdc28 y

su requerimiento para la progresión en mitosis, permanecieron con un contenido de DNA 2C y como células con una gran gema y núcleos no divididos (Figura R6B).

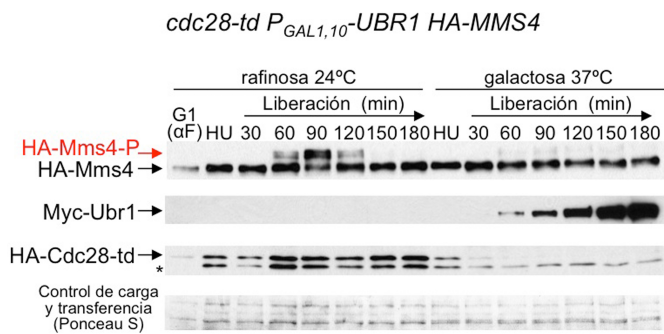
A



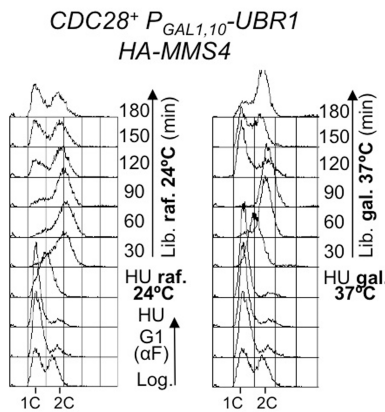
B



C



D



E

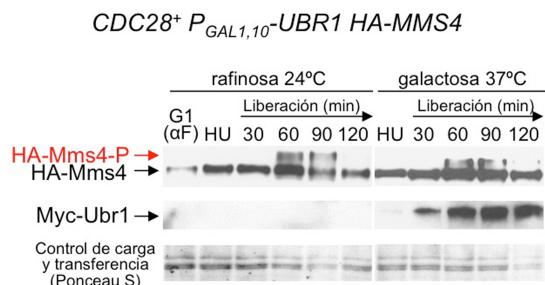


Figura R6. La fosforilación de Mms4 depende de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) Cdc28. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *cdc28-td P_{GAL1,10}-Myc-UBR1 HA-MMS4* (cepa YMG1) y control *CDC28⁺ P_{GAL1,10}-Myc-UBR1 HA-MMS4* (cepa YMG2) en la fase G1 con la feromona factor α , en condiciones permisivas (24°C, rafinosa). A continuación, ambos cultivos se liberaron en medio con hidroxurea (HU), para bloquear las células en fase S temprana. Tras ello, se dividió cada cultivo en dos y se mantuvieron en presencia de HU, uno de ellos en condiciones permisivas (24°C, rafinosa) y el otro en condiciones restrictivas (37°C, galactosa), para degradar Cdc28. Posteriormente, ambos cultivos se liberaron del bloqueo con HU en condiciones permisivas y restrictivas, respectivamente. (B) La progresión de las células *cdc28-td P_{GAL1,10}-Myc-UBR1 HA-MMS4* en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados. (C) Análisis de las proteínas HA-Mms4, Myc-Ubr1 y HA-Cdc28-td mediante inmunoblot a lo largo del experimento, en las células *cdc28-td P_{GAL1,10}-Myc-UBR1 HA-MMS4*. El asterisco indica una banda de reacción cruzada con el anticuerpo 12CA5 utilizado para la detección de la proteína HA-Cdc28-td. Como control de carga y transferencia se muestra la correspondiente membrana, teñida con Ponceau S. (D) La progresión de las células *CDC28⁺ P_{GAL1,10}-Myc-UBR1 HA-MMS4* en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados. (E) Análisis de las proteínas HA-Mms4 y Myc-Ubr1 mediante inmunoblot a lo largo del experimento, en las células *CDC28⁺ P_{GAL1,10}-Myc-UBR1 HA-MMS4*. Como control de carga y transferencia se muestra la correspondiente membrana, teñida con Ponceau S.

El análisis mediante inmunoblot (Figura R6C) mostró que, en condiciones permisivas, Mms4 presentaba una fosforilación dependiente de ciclo celular, como se ha mostrado previamente (Figuras 1-3): la banda de Mms4 modificada aparecía cuando las células alcanzaban un contenido de DNA 2C, según los datos obtenidos por citometría de flujo. De acuerdo con las condiciones permisivas del experimento, no se detectó Ubr1 y Cdc28 no se degradó. Sin embargo, bajo las condiciones restrictivas, Cdc28 se degradó a los 60 min tras la liberación del bloqueo con HU, coincidiendo con la detección de Ubr1, y la banda de migración electroforética lenta de Mms4 fue prácticamente indetectable (Figura R6C). Estos resultados no se debieron a la sobreexpresión de *UBR1* o a la incubación a 37°C, dado que en la cepa control *CDC28⁺ P_{Gal1-10}-UBR1 HA-MMS4* Mms4 se modificó con normalidad en las mismas condiciones experimentales llevadas a cabo con el mutante *cdc28-td* (Figura R6D-E). Estos resultados indican que la fosforilación de Mms4 durante el ciclo celular depende de la CDK Cdc28.

6. La fosforilación de Mms4 depende de la quinasa del tipo Polo (PLK) Cdc5

La ventana de tiempo en la que Mms4 se fosforila coincide aproximadamente con el periodo del ciclo celular en el que la quinasa del tipo Polo Cdc5 (PLK1 en células humanas) muestra un pico de expresión y actividad en *S. cerevisiae* (Cheng *et al*, 1998). Además, la secuencia de aminoácidos de Mms4 presenta tres sitios de acoplamiento potenciales para quinasas del tipo Polo: S-pS/pT-P/X, donde pS y pT son fosfo-serinas y fosfo-treoninas respectivamente (Elia *et al*, 2003a; Elia *et al*, 2003b). Las quinasas del tipo Polo se unen mediante dominios específicos (PBD) a estos sitios, que solapan con tres de los sitios consenso para CDK de Mms4 (Figura R7). Considerando todo ello, pensamos que Cdc5 podría estar también implicada en la fosforilación de Mms4 observada.

Para analizar esta hipótesis, estudiamos en primer lugar la expresión de Cdc5 en los experimentos llevados a cabo con el mutante *cdc28-td* descritos en el apartado anterior, y comprobamos mediante inmunoblot que el pico de expresión de esta proteína coincidía, como se esperaba, con el periodo de fosforilación de Mms4, a 24°C y 37°C, y tanto en células *CDC28⁺* como en *cdc28-td* (Figura R8A-B).

Mms4

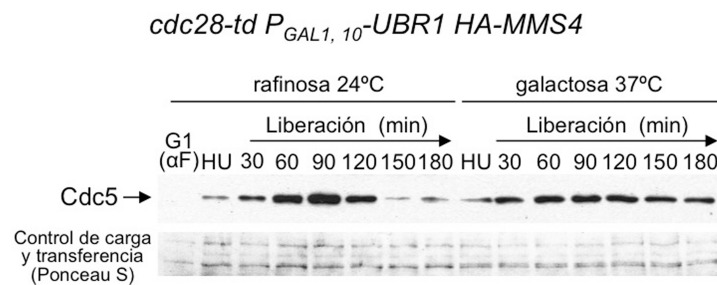
```

1  MSQIVDFVEDKDSRNDASIQIIDGPSNVEIIALSESMDQDECKRAHVSSA
51  EMIFSSPQRKSVSNDVENVDLNKSIELSAPFFQDISISKLDDFSTTVNSI
101 IDSSLRNENNAKGNAKKLLDDLLISDEWSADLESSGKKHNKSQYNLRDIAE
151 KGVQSLKNPEPIAVDCEYKTOGIGKTNSDISDSPKSQIGAADILFDFPL
201 SPVKHENPTEEKHNSIANENSSFDNSLKPAGKQNHGEDGTSMKRKYNGK
251 EDEQEHLPKGGKRTIALSRTLINSTKLPDTVELNLSKFLDSSDSITTDVL
301 STPAKGSNIVRTGSQPIFSNANCFQEAKRSTLTAEDEPKCTKNTAREVSQ
351 LENYIAYGQYYTREDSEKSKIRHLLKENKNAFKRVNQIYRDNKARSQMII
401 EFSPSLLQLFKKGDSLQQLAPAVVQSSYNDMSPLLRFLRKCDSIYDFS
451 NDFYPCDPKIVEENVLILYYDAQEFFEQYTSQKKELYRKIRFFSKNGKH
501 VILILSDINKLKRAIFQLENEKYKARVEQRLSGTEEALRPRSKSSQVGK
551 LGIKKFDLEQRLRFIDREWHVKIHTVNSHMEFINSLPNLVSLIGKQRMDF
601 AIRYMKYAHNVKSAQDSTETLKKTFHQIGRMPKANNVSVLYPSFQSL
651 LEDIEKGRLQSDNEGKYLMTAEVEKRLYKLTCTDPNDTIE*

```

Figura R7. La proteína Mms4 presenta posibles sitios de acoplamiento para quinasas del tipo Polo. Secuencia de aminoácidos de la proteína Mms4. Se destacan en verde los sitios consenso completos [(S/T)-P-X-(K/R)] y mínimos [(S/T)-P] de fosforilación por CDK. Se resaltan mediante recuadros los sitios potenciales de acoplamiento para PLK (S-pS/pT-P/X).

A



B

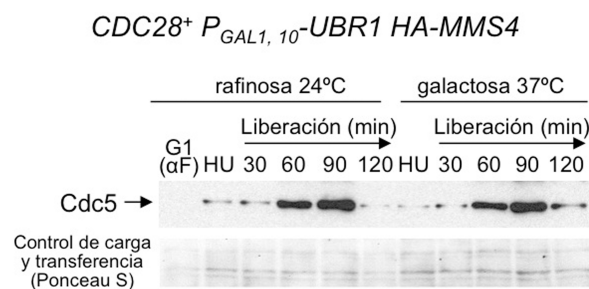


Figura R8. Correlación temporal entre la fosforilación de Mms4 y el pico de expresión de Cdc5 (PLK) en el ciclo celular. (A) Análisis de la expresión de Cdc5 mediante inmunoblot en la cepa *cdc28-td HA-MMS4 P_{GAL1, 10}-Myc-UBR1* (YMG1). (B) Análisis de la expresión de Cdc5 mediante inmunoblot en la cepa control *CDC28⁺ HA-MMS4 P_{GAL1, 10}-Myc-UBR1* (YMG2). Las muestras proteicas empleadas en (A) y (B) proceden de los experimentos mostrados en la figura R6. Como control de carga y transferencia se muestra en ambos casos la correspondiente membrana, teñida con Ponceau S.

A continuación, para estudiar la posibilidad de que Cdc5 participara en la modificación de Mms4, analizamos la fosforilación de esta proteína en el mutante condicional termosensible *cdc5-1* (Figura R9).

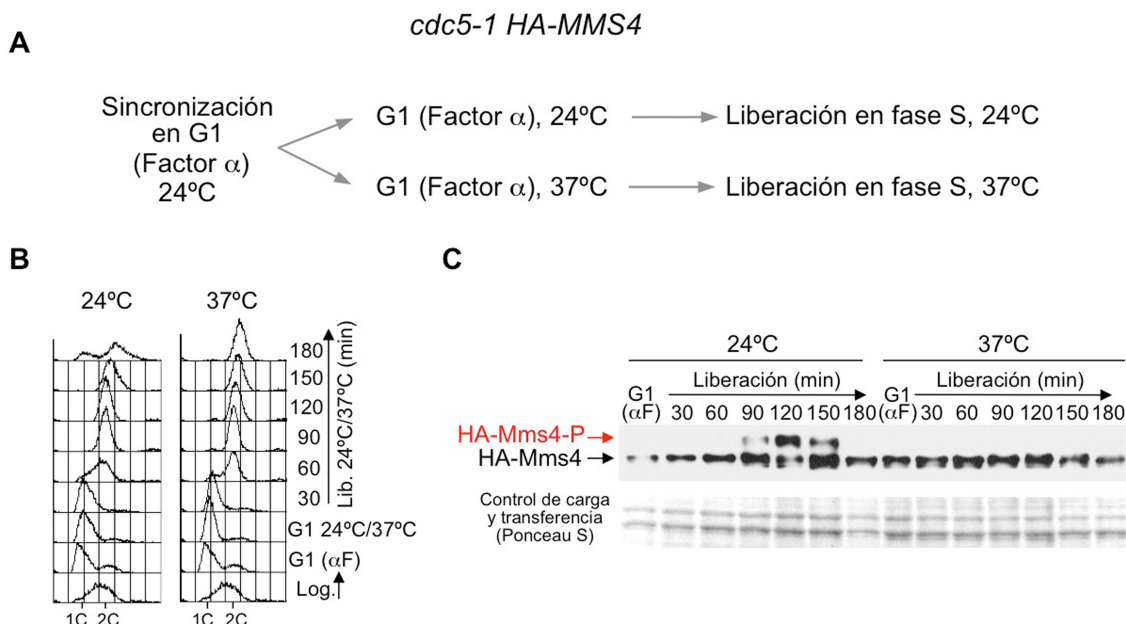


Figura R9. La fosforilación de Mms4 en el ciclo celular depende de Cdc5 (PLK). (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *cdc5-1 HA-MMS4* (cepa YMG3) en la fase G1 con la feromona factor α , tras lo que se dividió el cultivo en dos: uno de ellos se mantuvo en G1 a temperatura permisiva (24°C) y el otro a temperatura restrictiva (37°C), para inactivar Cdc5. Posteriormente ambos cultivos se liberaron en la fase S a 24°C y 37°C, respectivamente. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. (C) Análisis de la proteína HA-Mms4 mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S.

Para ello, se crecieron células *cdc5-1 HA-MMS4* a la temperatura permisiva de 24°C y se sincronizaron en la fase G1 con factor α . Tras ello, el cultivo se dividió en dos: una parte se mantuvo en G1 a 24°C y la otra se mantuvo en G1 a la temperatura restrictiva de 37°C, en ambos casos durante 60 min. Después, cada cultivo se liberó del bloqueo en G1 a 24°C o 37°C, respectivamente (Figura R9A). El análisis de la progresión en el ciclo celular por citometría de flujo indicó que las células completaron la replicación del DNA a los 90-120 min tras la liberación de G1, tanto a 24°C como a 37°C (Figura R9B). A la temperatura permisiva, las células continuaron su progresión en el ciclo celular, mientras que, a la temperatura restrictiva, debido a la inactivación de Cdc5 y su requerimiento para la progresión en mitosis, las células quedaron bloqueadas con un contenido de DNA 2C y cromatina no dividida. El análisis de Mms4 por inmunoblot (Figura R9C) mostró que, a la temperatura permisiva (24°C), la forma fosforilada de Mms4 se detectaba claramente entre los 90 y los 120 min tras la

liberación de G1, cuando las células habían alcanzado un contenido en DNA 2C. Sin embargo, tras la inactivación de Cdc5 a la temperatura restrictiva, la banda de migración electroforética correspondiente a la forma modificada de Mms4 no fue detectada. Estos resultados indican que, además de Cdc28, la quinasa del tipo Polo Cdc5 también se requiere para la fosforilación de Mms4 dependiente de ciclo celular.

7. La fosforilación de Mms4 no depende de ciclinas específicas

Los resultados mostrados anteriormente indicaron que la fosforilación de Mms4 encontrada depende de las quinasas Cdc28 (CDK) y Cdc5 (PLK). Estos datos, junto con las características de la secuencia de aminoácidos de Mms4 ya explicadas, sugieren que Cdc28 podría estar fosforilando esta proteína, preparándola así para su posterior fosforilación por Cdc5. Teniendo esto en cuenta, nos preguntamos si Cdc28 podría estar actuando sobre Mms4 durante la fase S o, si por el contrario, su acción ocurriría únicamente en G2/M. Puesto que la función de Cdc28 depende de las ciclinas a las que esta CDK se asocia en las distintas fases del ciclo celular (Mendenhall y Hodge, 1998), pensamos que para contestar esta pregunta podríamos analizar el papel de los distintos tipos de ciclinas en la fosforilación de Mms4.

Dado que Mms4 se fosforila en la ventana de tiempo comprendida entre el final de la fase S y la segregación cromosómica, analizamos en primer lugar si las ciclinas mitóticas regulan la modificación de Mms4 dependiente de Cdc28. Para ello, se etiquetó Mms4 con el epítipo HA en el cuádruple mutante *clb1Δclb2-Vlclb3Δclb4Δ*. Puesto que la eliminación de las cuatro ciclinas es letal para las células (Mendenhall y Hodge, 1998), utilizamos mutantes nulos de tres de ellas, y un mutante condicional termosensible de Clb2, *clb2-VI* (Amon *et al*, 1993). En estos experimentos, se crecieron células *clb1Δclb2-Vlclb3Δclb4Δ HA-MMS4* a 24°C y se sincronizaron en la fase G1 con factor α. El cultivo se dividió a continuación en dos: una parte se mantuvo en G1 a 24°C y la otra se mantuvo en G1 a la temperatura restrictiva (38°C), en ambos casos durante 60 min. Después, cada cultivo se liberó del bloqueo en G1 a 24°C o 38°C, respectivamente (Figura R10A).

El análisis de la progresión en el ciclo celular por citometría de flujo (Figura R10B) indicó que las células completaron la replicación del DNA a los 45-60 min tras la liberación de G1, tanto a 24°C como a 38°C. A la temperatura permisiva, las células continuaron su progresión en el ciclo celular, mientras que, a la temperatura restrictiva, debido a la inactivación de Clb2 y a la ausencia del resto de ciclinas requeridas para la progresión en mitosis, se bloquearon con un contenido de DNA 2C. El análisis de Mms4 mediante inmunoblot mostró que tanto a la temperatura permisiva (24°C) como

a la restrictiva (38°C), la forma fosforilada de Mms4 aparecía a partir de los 60 min tras la liberación del bloqueo en G1 (Figura R10C), cuando las células habían alcanzado claramente un contenido de DNA 2C. A la temperatura restrictiva, con Clb2 inactivada y el resto de las ciclinas mitóticas ausentes, la banda correspondiente a Mms4 fosforilada se mantuvo a lo largo del experimento, como consecuencia del bloqueo en mitosis (Figura R10C).

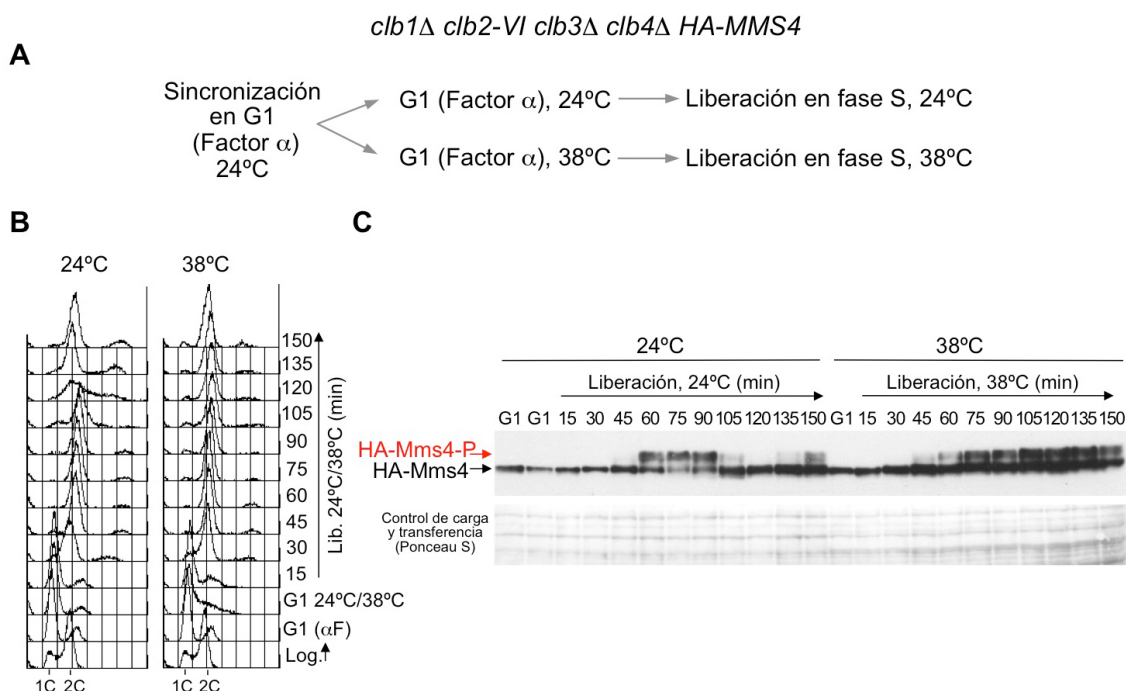


Figura R10. Mms4 se fosforila en ausencia de las ciclinas mitóticas. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *clb1Δclb2-VIclb3Δclb4Δ HA-MMS4* (cepa YMG45) en la fase G1 con la feromona factor α , a temperatura permisiva (24°C). A continuación, se dividió el cultivo en dos y ambos se mantuvieron en G1, uno de ellos a temperatura permisiva (24°C) y el otro a temperatura restrictiva (38°C), para inactivar Clb2. Posteriormente, ambos cultivos se liberaron en la fase S en condiciones permisivas y restrictivas, respectivamente. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. (C) Análisis de la proteína HA-Mms4 mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S.

Estos resultados indican que las ciclinas mitóticas no son esenciales para la fosforilación de Mms4 dependiente de ciclo celular. A su vez, sugieren que las ciclinas de la fase S, Clb5 y Clb6, que actúan antes que Clb1-4, podrían ser suficientes para la posible función de Cdc28 en la preparación de Mms4 para su posterior fosforilación por Cdc5.

Para estudiar la relevancia de las ciclinas Clb5 y Clb6 en la fosforilación de Mms4 dependiente de Cdc28, se etiquetó Mms4 con el epítipo HA en el doble mutante de delección *clb5Δclb6Δ*. Se partió de cultivos logarítmicos de células

clb5Δclb6Δ HA-MMS4, que se sincronizaron en G1 por la adición al medio de cultivo de la feromona factor α . A continuación, las células se liberaron del bloqueo en G1 en medio fresco y se les permitió progresar en el ciclo celular (Figura R11A). Como se observa en el análisis por citometría de flujo (Figura R11B), las células tardaron en entrar en la fase S como consecuencia de la ausencia de las ciclinas Clb5 y Clb6, pero después progresaron normalmente en el ciclo celular.

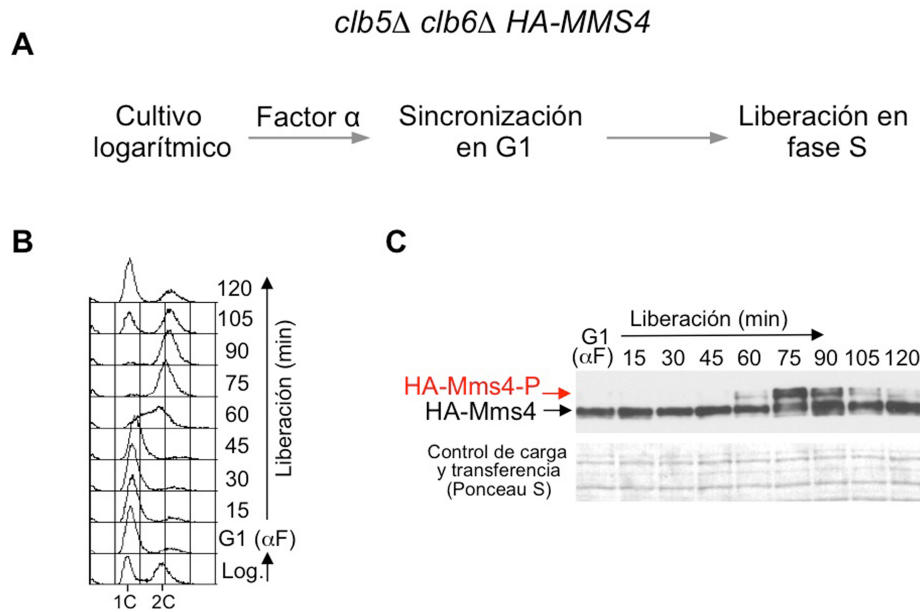


Figura R11. Mms4 se fosforila en ausencia de las ciclinas de la fase S. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *clb5Δclb6Δ HA-MMS4* (cepa YMG6) en la fase G1 con la feromona factor α y se liberaron posteriormente en la fase S. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. (C) Análisis de la proteína HA-Mms4 mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S.

El análisis de Mms4 por inmunoblot (Figura R11C) reveló que esta subunidad se fosforila a partir de los 60 min tras la liberación en la fase S, cuando las células han replicado la mayor parte de su DNA. Posteriormente, la banda correspondiente a la proteína fosforilada desaparece progresivamente a medida que las células entran en un nuevo ciclo celular. Estos resultados indican que Mms4 puede fosforilarse en ausencia de las ciclinas de la fase S y, por tanto, ponen de manifiesto que, o bien estas ciclinas no se requieren de manera específica para la fosforilación de Mms4, o bien, que a pesar de que la fosforilación de Mms4 dependiente de Cdc28 requiera de la unión de esta quinasa a ciclinas de la fase S, en ausencia de las mismas su función puede ser sustituida por las ciclinas mitóticas, que actúan más tarde en el ciclo celular.

8. La expresión ectópica de Cdc5 (PLK) induce la fosforilación prematura de Mms4

Los datos mostrados anteriormente indican que la fosforilación de Mms4 depende de Cdc28 y Cdc5, y sugieren además que las ciclinas de la fase S son suficientes para la función de Cdc28 en la modificación de esta proteína. Dado que la función de Cdc28 depende de la ciclina a la que se asocie, pero la expresión de Cdc5 solo ocurre después de que las células hayan terminado la mayor parte de la replicación cromosómica, pensamos que las conclusiones obtenidas a partir de los resultados conseguidos hasta ahora podrían reforzarse si pudiéramos inducir la fosforilación prematura de Mms4 mediante la expresión ectópica de Cdc5.

El gen *CDC5* es esencial y, por ello, para realizar este estudio se introdujo en la cepa *HA-MMS4* una copia extra del mismo, bajo el control del promotor *GAL1,10*. En estos experimentos se partió tanto de células *CDC5⁺ HA-MMS4*, usadas como control, como de células *CDC5⁺ P_{GAL1,10}-CDC5 HA-MMS4*. Las células se sincronizaron en G1 con factor α en presencia de glucosa como fuente de carbono (promotor *GAL1,10* inactivo). A continuación, los cultivos se dividieron en dos partes, una de las cuales se mantuvo durante 60 min en G1 en un medio con glucosa, mientras la otra se mantuvo en G1 durante el mismo tiempo en un medio con galactosa (promotor *GAL1,10* activado), para inducir la expresión de la copia extra de *CDC5*. Seguidamente, ambos cultivos se liberaron en la fase S en medio fresco con glucosa o galactosa, respectivamente (Figura R12A). La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento fue seguida por citometría de flujo (Figuras R12B y R12D), y la proteína Mms4 fue analizada en cada caso por inmunoblot (Figuras R12C y R12E).

En las células *HA-MMS4 CDC5⁺* crecidas en medio con glucosa, la forma fosforilada de Mms4 se detectó a partir de los 45 min tras la liberación en la fase S (Figura R12C, panel superior), y a partir de los 60 min cuando se crecieron en medio con galactosa. Estos tiempos coinciden con el momento en el que las células habían alcanzado un contenido de DNA 2C (Figura R12B), así como con el pico de expresión de la proteína Cdc5 endógena (Figura R12C, panel inferior). En presencia de glucosa en el medio, las células *CDC5⁺ P_{GAL1,10}-CDC5 HA-MMS4* presentaron un patrón de fosforilación de Mms4 muy similar al de las células utilizadas como control (Figura R12E). Cuando se crecieron en medio con galactosa, sin embargo, se adelantó la expresión de Cdc5, de manera que la proteína fue claramente detectable por inmunoblot desde los 15 min tras la liberación en la fase S (Figura R12E, panel superior). La fosforilación de Mms4 se detectó también a partir de los 30 min tras la liberación en la fase S, cuando, de acuerdo con los datos obtenidos por citometría de

flujo (Figura R12D), las células aún no habían completado la replicación del DNA. Esto difiere claramente de las células *CDC5⁺ HA-MMS4*, en las que la fosforilación de Mms4 se detectó a los 60 min bajo las mismas condiciones (Figura R12C).

Estos datos muestran que la expresión ectópica de Cdc5 puede inducir la fosforilación prematura de Mms4 en la fase S, confirmando la implicación de Cdc5 en la modificación de esta proteína. Además, refuerzan la idea de que las ciclinas de la fase S, las únicas presentes en el momento de inducción de la copia extra de *CDC5*, permiten que Cdc28 ejerza su función en la fosforilación de Mms4.

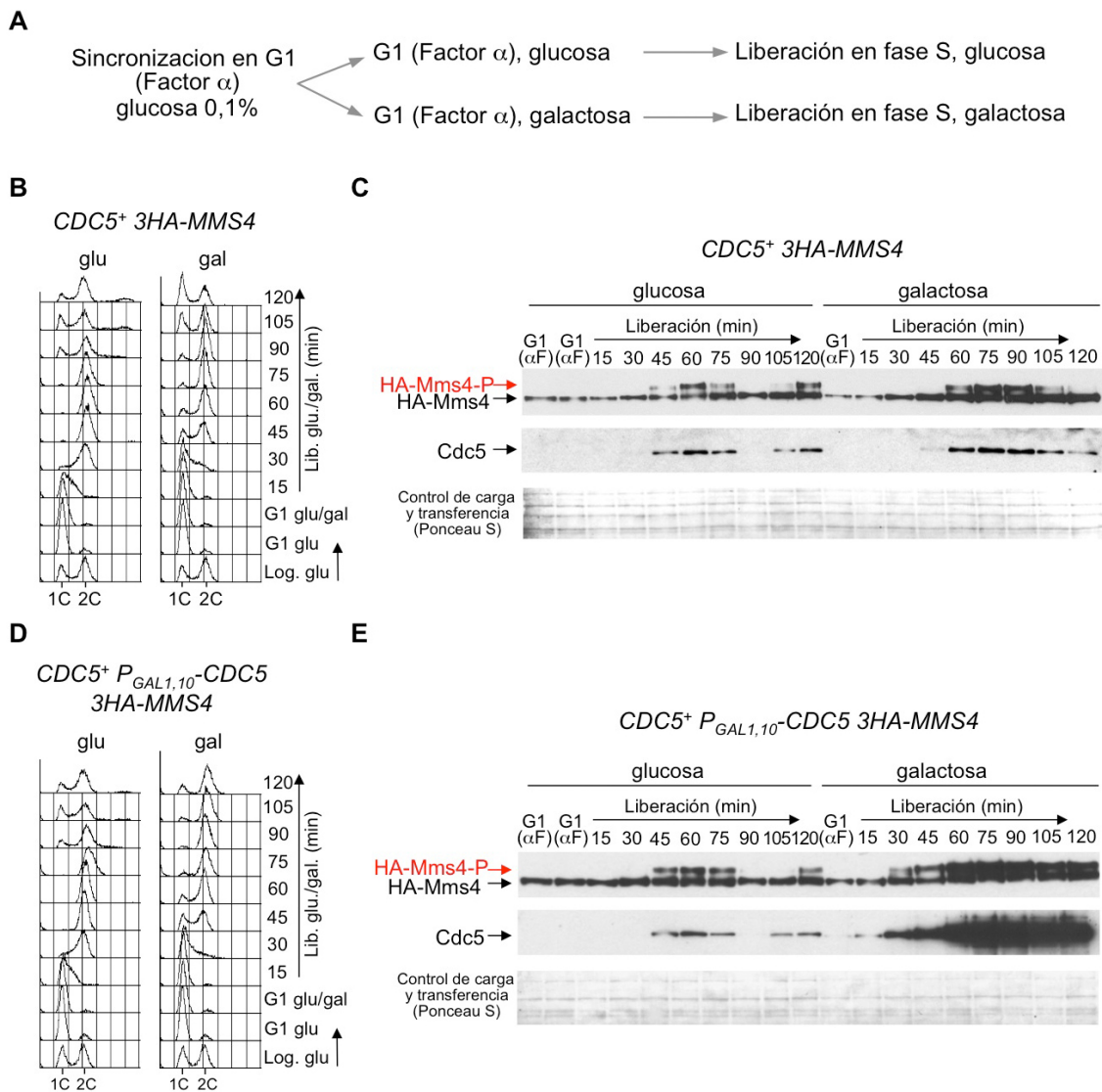


Figura R12. La expresión ectópica de Cdc5 (PLK) induce la fosforilación prematura de Mms4. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *CDC5⁺ HA-MMS4* (cepa YMG33) y *CDC5⁺ P_{GAL1,10}-CDC5 HA-MMS4* (cepa YMG24) en la fase G1 con la feromona factor α , en medio con baja concentración de glucosa. A continuación, se dividió el cultivo en dos partes que se mantuvieron en G1, una de ellas en presencia de glucosa (promotor *GAL1,10* inactivo) y la otra en presencia de galactosa (promotor *GAL1,10* activo). A continuación, ambos cultivos se liberaron en la fase S en medio fresco con glucosa o galactosa, respectivamente. **(B)** La progresión de las células control *CDC5⁺ HA-MMS4* en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. **(C)** Análisis de las proteínas HA-Mms4 y Cdc5 mediante inmunoblot a lo largo del

experimento, en las células *CDC5⁺ HA-MMS4*. Como control de carga y transferencia se muestra la correspondiente membrana, teñida con Ponceau S. (D) La progresión de las células *CDC5⁺ P_{GAL1,10}-CDC5 HA-MMS4* en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo (E) Análisis de las proteínas HA-Mms4 y Cdc5 mediante inmunoblot a lo largo del experimento, en las células *CDC5⁺ P_{GAL1,10}-CDC5 HA-MMS4*. Como control de carga y transferencia se muestra la correspondiente membrana, teñida con Ponceau S.

9. La fosforilación de Mms4 se correlaciona con una alta actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4

Para investigar el significado biológico de la fosforilación de Mms4, analizamos la actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4 a lo largo del ciclo celular. Para ello construimos previamente una cepa que expresaba Mms4 etiquetada con el epítipo TAP, que pensamos podría facilitar la purificación de esta proteína. Las células *MMS4-TAP* se comportaron como las células *HA-MMS4*, ya que la proteína Mms4-TAP mostró un patrón de fosforilación a lo largo del ciclo celular similar al obtenido con la proteína HA-Mms4 en los experimentos mostrados anteriormente (Figura R13).

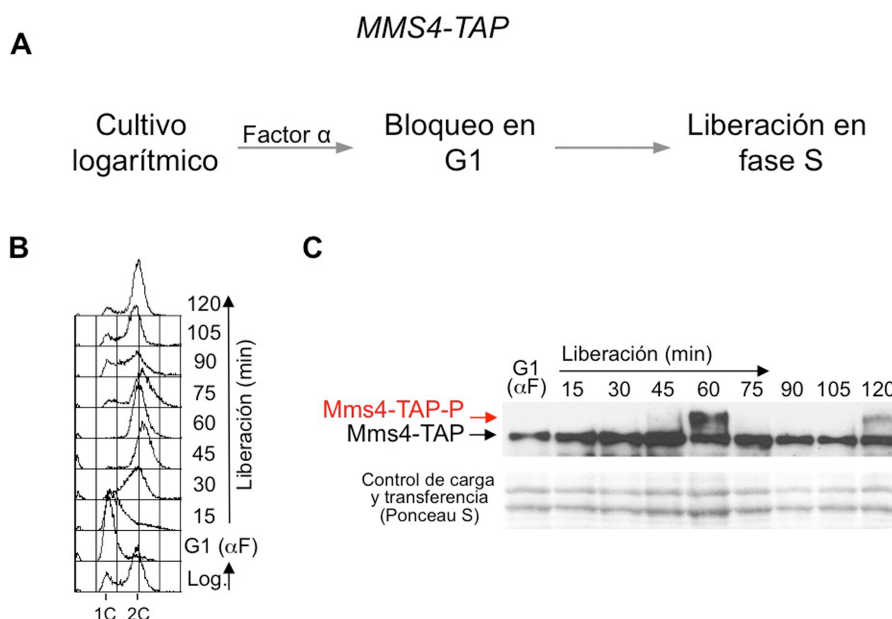


Figura R13. El patrón de fosforilación de Mms4 durante el ciclo celular se mantiene en células *MMS4-TAP*. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *MMS4-TAP* (cepa YSG22) en la fase G1 con la feromona factor α y se liberaron posteriormente en la fase S. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo a los tiempos indicados en la figura. (C) Análisis de la proteína Mms4-TAP mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S.

Para llevar cabo los ensayos de actividad nucleasa, se sincronizaron células *MMS4-TAP* en la fase G1 utilizando factor α , en fase S temprana con HU y en G2/M usando nocodazol, y se obtuvieron extractos celulares. Como muestran los inmunoblots (Figura R14, paneles superiores), Mms4-TAP se encontraba hiperfosforilada en las células bloqueadas en G2/M, mientras que la banda de

migración electroforética lenta no se detectó ni en células bloqueadas en G1 ni en células bloqueadas en fase S temprana. En todos los casos, Mms4 se inmunoprecipitó a partir de los extractos celulares y se ensayó la actividad nucleasa (Figura R14, paneles inferiores). Como sustratos se usaron diferentes estructuras sintéticas marcadas con P^{32} que pueden ser generadas en diferentes situaciones y son dianas potenciales de Mus81-Mms4 durante la fase S: un 3'-*flap* (Figura R14A), una horquilla de replicación modelo (Figura R14B) y una unión de Holliday con mella (nHJ) (Figura R14C). Aunque Mms4 no tiene actividad catalítica, se ha demostrado que la inmunoprecipitación de Mms4-TAP a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos asincrónicos presenta actividad nucleasa, lo cual indica que el complejo Mus81-Mms4 inmunoprecipita completo y es funcional en estas condiciones (Ip *et al*, 2008).

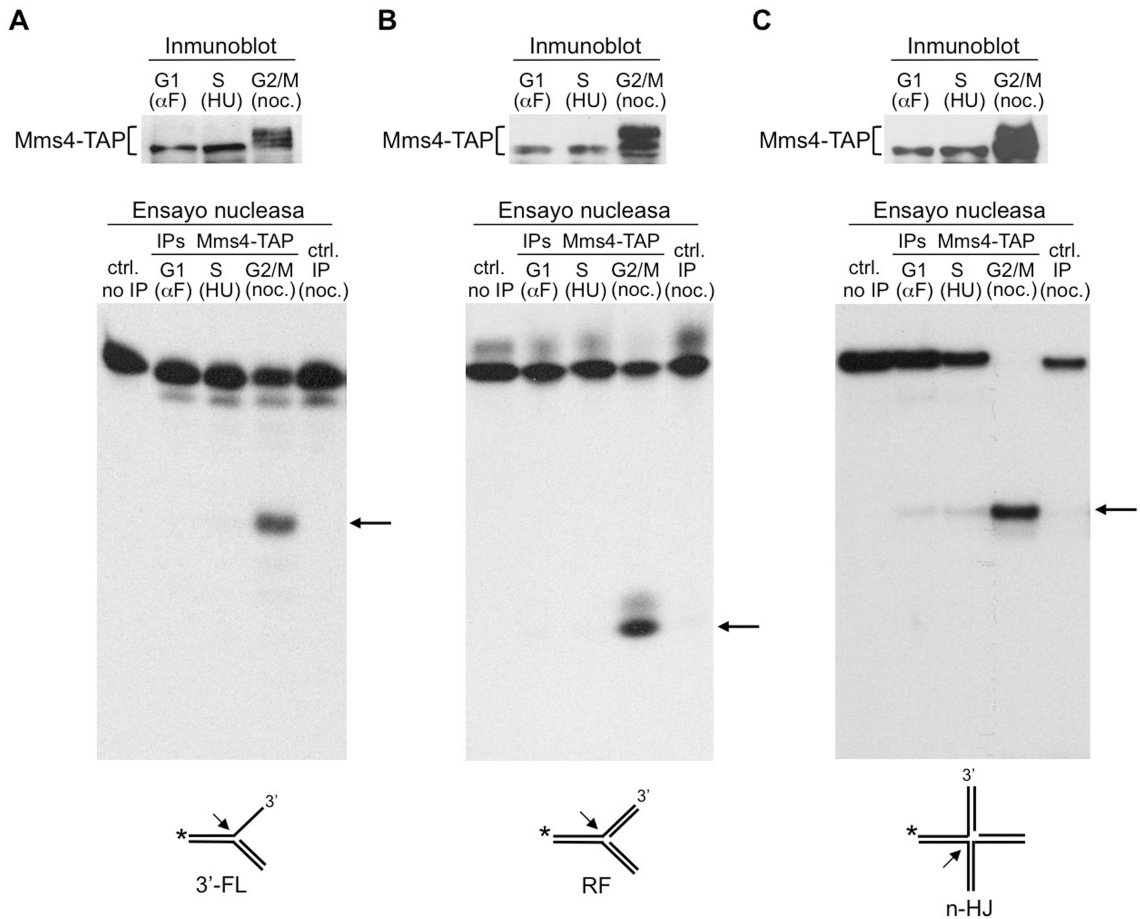


Figura R14. La fosforilación de Mms4 se correlaciona con la adquisición de alta actividad endonucleasa por el complejo Mus81-Mms4. Se obtuvieron extractos a partir de células *MMS4-TAP* (cepa YSG22) sincronizadas en G1 con factor α , en fase S con HU y en G2/M con nocodazol. La proteína Mms4-TAP se analizó mediante inmunoblot (A-C, paneles superiores). En todos los casos, Mms4-TAP se purificó a partir de extractos celulares por inmutofinidad. Su actividad nucleasa se ensayó (paneles inferiores) sobre tres sustratos diferentes marcados radiactivamente con P^{32} : una estructura 3'-*flap* (3'-FL) (A), una horquilla de replicación modelo (RF) (B) y una unión de Holliday con mella (nHJ) (C). Las flechas indican el producto resultante de la escisión nucleolítica de cada sustrato. Se incluyeron dos tipos de control: ensayos nucleasa con extractos proteicos inmunoprecipitados a partir de células no etiquetadas bloqueadas en G2/M (ctrl IP noc.) y reacciones llevadas a cabo en ausencia de extracto proteico (ctrl. no IP).

La Figura R14 muestra que la actividad nucleasa de Mus81-Mms4 es claramente diferente en las distintas etapas del ciclo celular analizadas. Así, con las tres estructuras utilizadas en el ensayo, se detectó una actividad nucleasa muy baja cuando Mms4 se inmunoprecipitó a partir de extractos obtenidos de cultivos bloqueados en G1 o fase S temprana. Sin embargo, la actividad nucleasa fue muy alta cuando Mms4 se purificó a partir de extractos obtenidos de células bloqueadas en G2/M, dado que aparecieron fragmentos marcados producto de la reacción en todos los casos. Estos resultados indican la existencia de una estrecha correlación entre la fosforilación de la subunidad no catalítica, Mms4, y la adquisición de actividad nucleasa por el complejo Mus81-Mms4, que permite el procesamiento de los sustratos ensayados. Todos estos datos indican, por tanto, una estricta regulación del complejo Mus81-Mms4 a lo largo del ciclo celular, que solo se activa cuando las células finalizan la fase S.

10. La actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4 está reducida en un mutante de *mms4* defectivo en fosforilación

Los resultados mostrados en la Figura R14 indican que la fosforilación de Mms4 dependiente de Cdc28 y Cdc5 es necesaria para la regulación de la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4. Para analizar en más profundidad las consecuencias de la fosforilación de Mms4, se construyó un mutante de *MMS4*, *msm4-np*, que codifica una proteína en la que todas las serinas y treoninas en los sitios consenso de fosforilación por CDK y las tres serinas adyacentes que podrían ser parte de los potenciales sitios de acoplamiento para Cdc5 fueron sustituidas por alaninas (Figura R15). Para comenzar la caracterización de este mutante, se partió de un cultivo exponencial de células *mms4-np*, las cuales se sincronizaron en G1 con factor α y se liberaron después en medio fresco (Figura R16A). El análisis por citometría de flujo y la estimación del porcentaje de células gemadas y binucleadas indicaron que las células *mms4-np* se comportan como las células *MMS4*⁺ en cuanto a la progresión en el ciclo celular (Figura R16B-C). Se tomaron muestras de células a intervalos regulares a lo largo del experimento para el análisis mediante inmunoblot. Este análisis reveló que, al contrario de lo que ocurre con la proteína Mms4 en la cepa silvestre, la proteína mutante Mms4-np no se hiperfosforila durante el ciclo celular (Figura R16D). Este resultado refuerza la idea de que Mms4 es un sustrato directo de fosforilación por Cdc28 y Cdc5, y además proporciona una herramienta para el estudio del significado funcional de la fosforilación de Mms4.

Mms4-np

```

1  MSQIVDFVEDKDSRNDASIQIIDGPSNVEIIALSESMDQDECKRAHVSSA
51  EMIFAAPQRKSVSNDVENVDLNKSIELSAPFFQDISISKLDDFSTTVNSI
101 IDSSLRNENNAKGNACKLLDDLISDEWSADLESSGKKHNKSQYNLRDIAE
151 KWGVQSLKNPEPIAVDCEYKTOGIGKTNSDISDAAPKSQIGAADILFDFPL
201 AAPKHENPTEEKHNSIANENAAPDNSLKPAGKQNHGEDGTSMAKRVYNKG
251 EDEQEHLPKGKKRTIALSRTLINSTKLDPDTVELNLSKFLDSSDSITTDVL
301 AAPAKGSNIVRTGSQPIFSNANCFQEAKRSKTLTAEDPKCTKNTAREVSQ
351 LENYIAYGQYYTREDSSKNKIRHLLKENKNAFKRVNQIYRDNIAKARSQMII
401 EFAAPSLLQLFKKGSDSLQQLAPAVVQSSYNDSMPLLRFLRKCDSIYDFS
451 NDFYYPCKPKIVEENVLILYYDAQEFFEQYTSQKKELYRKIRFFSKNGKH
501 VILILSDINKLKRAIFQLENEKYKARVEQRLSGTEEALRPRSKSSQVGK
551 LGIKKFDLEQRLRFIDREWHVKIHTVNSHMEFINSLPNLVSLIGKQRMDF
601 AIRYMKYAHNLVKSADSTETLKKTFHQIGRMPEMKANNVVSLYPSFQSL
651 LEDIEKGRLOSDNEGKYLMTAEVEKRLYKLFCTCTDPNDTIE*

```

Figura R15. Secuencia de aminoácidos de la proteína mutante Mms4-np. Se resaltan mediante recuadros los sitios consenso de fosforilación por CDK (verde) y de acoplamiento para quinasas del tipo Polo (azul). Se resaltan en rojo y negrita los residuos que fueron sustituidos por alaninas.

A continuación, llevamos a cabo un ensayo de actividad nucleasa utilizando el mutante defectivo en fosforilación *mms4-np* (Figura R16E). Para ello se sincronizaron células *HA-mms4-np* en G2/M mediante la adición de nocodazol al medio de cultivo, dado que, en esta fase del ciclo celular, el complejo Mus81-Mms4 presenta una elevada actividad nucleasa, como se ha mostrado anteriormente (Figura R14). Como muestra el inmunoblot, al contrario de lo que ocurre con Mms4, Mms4-np no se hiperfosforila en G2/M (Figura R16E, panel superior). Mms4-np se inmunoprecipitó de las células bloqueadas en G2/M (Figura R16E) y se llevó a cabo un ensayo de actividad nucleasa usando como sustrato un 3'-*flap* marcado con P³² (Figura R16E, panel inferior), que se comparó con otro ensayo llevado a cabo con células *MMS4*⁺ control bajo las mismas condiciones experimentales. En la Figura R16E se muestra que la actividad nucleasa del mutante *mms4-np* estaba fuertemente reducida en comparación con las células *MMS4*⁺, como se deduce de la aparición de considerablemente menos producto de reacción marcado en el caso del mutante. Este resultado muestra que la fosforilación de la subunidad Mms4 se requiere para el normal funcionamiento del complejo Mus81-Mms4.

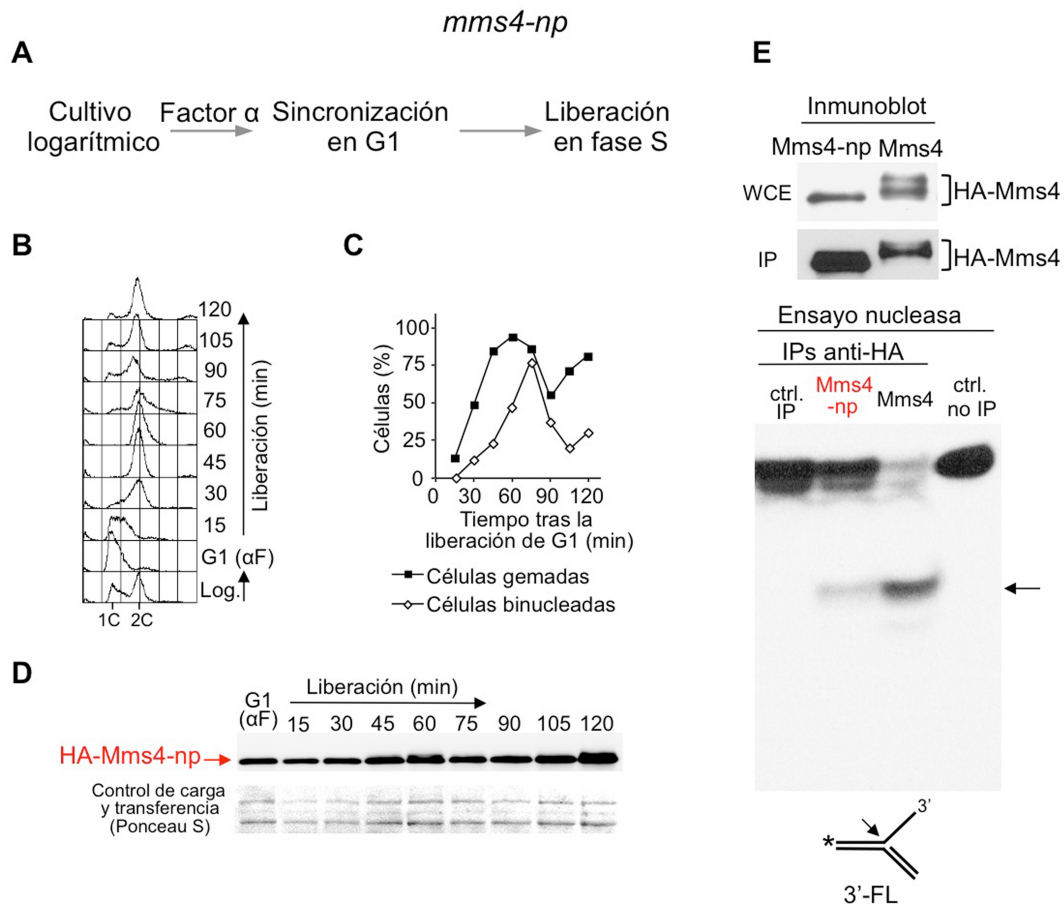


Figura R16. El mutante defectivo en fosforilación *mms4-np* presenta una actividad nucleasa reducida. (A-D) Caracterización del mutante *mms4-np* en el ciclo celular. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *HA-mms4-np* (cepa YMG11) en la fase G1 con la feromona factor α y se liberaron posteriormente en la fase S. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo a los tiempos indicados en la figura. (C) Representación gráfica del porcentaje de células gemadas y binucleadas en cada tiempo. (D) Análisis de la proteína HA-Mms4-np mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S. (E) Análisis de la actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4. Se obtuvieron extractos a partir de células *HA-mms4-np* (cepa YMG11) y *HA-MMS4* (cepa YMV33) sincronizadas en G2/M con nocodazol. La fosforilación de las proteínas Mms4 y Mms4-np presentes en los extractos celulares totales (WCE), así como el rendimiento de la inmunoprecipitación de ambas (IP) se analizó mediante inmunoblot (paneles superiores). En los geles se cargó en cada caso aproximadamente el 2% del total del inmunoprecipitado. El ensayo de actividad nucleasa se llevó a cabo usando como sustrato una estructura 3'-flap (3'-FL) (panel inferior). La flecha indica el producto resultante de la escisión nucleolítica del sustrato. Se incluyeron dos tipos de control: ensayos nucleasa con extractos proteicos inmunoprecipitados a partir de células no etiquetadas bloqueadas en G2/M y reacciones llevadas a cabo en ausencia de extracto proteico.

11. La deficiencia en la fosforilación de Mms4 aumenta la sensibilidad de las células que carecen de la helicasa del tipo RecQ Sgs1 a agentes que causan daño en el DNA o estrés replicativo

Para profundizar en la relevancia biológica de la fosforilación de Mms4, estudiamos la importancia de la modificación de esta proteína en la respuesta celular a diferentes agentes que interfieren con la replicación del DNA. Para ello, mediante

ensayos de gota en placa (Figura R17), analizamos la sensibilidad de las células *mms4-np* a distintos agentes genotóxicos que causan daño en el DNA o estrés replicativo y pueden interferir con la progresión de las horquillas de replicación: Metil metanosulfonato (MMS), 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), hidroxurea (HU) y cisplatino. Al igual que los mutantes *mus81Δ*, las células *mms4Δ* son sensibles a todos estos agentes; sin embargo, *mms4-np* no mostró una sensibilidad significativa a ninguno de los tratamientos (Figura R17).

Mus81-Mms4 coopera con la resolvasa Yen1 en la reparación del daño en el DNA (Agmon *et al*, 2011; Blanco *et al*, 2010; Ho *et al*, 2010; Tay y Wu, 2010). Además, Mus81-Mms4 presenta solapamiento funcional con el complejo helicasa del tipo RecQ Sgs1-Top3-Rmi1, implicado en la disolución de algunos intermediarios de DNA que se generan durante la replicación en presencia de daño en el DNA o estrés replicativo (Ashton *et al*, 2011; Doe *et al*, 2002; Hickson y Mankouri, 2011; Kaliraman *et al*, 2001; Osman y Whitby, 2007). Por ello, estudiamos la sensibilidad de las células *mms4-np* a los mismos agentes citados anteriormente en ausencia de Yen1 o de la helicasa Sgs1, mediante ensayos de gota en placa. Como se observa en la Figura R17, al contrario que el mutante *yen1Δmms4Δ*, las células *yen1Δmms4-np* no mostraron defectos en el crecimiento ni hipersensibilidad a los agentes ensayados. Estos resultados sugieren que, a pesar de que la actividad nucleasa de Mus81-Mms4 está claramente reducida cuando Mms4 no se fosforila (Figura R16), la actividad residual del complejo es suficiente para conferir resistencia frente a los agentes ensayados, incluso en ausencia de la resolvasa Yen1 (Figura R17).

Aunque los mutantes *mus81Δ* y *mms4Δ* son sintéticamente letales con *sgs1Δ*, las células *sgs1Δmms4-np* son viables, lo cual sugiere que la actividad residual conferida por Mms4-np es suficiente para su supervivencia. Esta cepa ofrece, por tanto, una herramienta útil para analizar las consecuencias de la actividad defectiva de Mus81-Mms4 sobre la reparación del DNA en ausencia de Sgs1. Como se muestra en la Figura R17, la sensibilidad de las células *sgs1Δ* a MMS, 4NQO e HU aumentó considerablemente cuando se combinaron con el mutante *mms4-np*. En el caso de las células tratadas con cisplatino, el aumento de sensibilidad fue moderado. De acuerdo con la sensibilidad de las células *yen1Δmms4-np* y *sgs1Δyen1Δ* a estos agentes, el triple mutante *sgs1Δyen1Δmms4-np* no mostró diferencias significativas con respecto al mutante *sgs1Δmms4-np*. Estos datos indican que, aunque la baja actividad nucleasa del mutante *mms4-np* es suficiente para responder al daño en el DNA o al estrés replicativo cuando Sgs1 está presente, en ausencia de esta helicasa las células requieren una completa actividad Mus81-Mms4, para lo cual se requiere la correcta

fosforilación de Mms4. Todo ello resalta la importancia de la fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4 para la función endonucleasa de Mus81-Mms4.

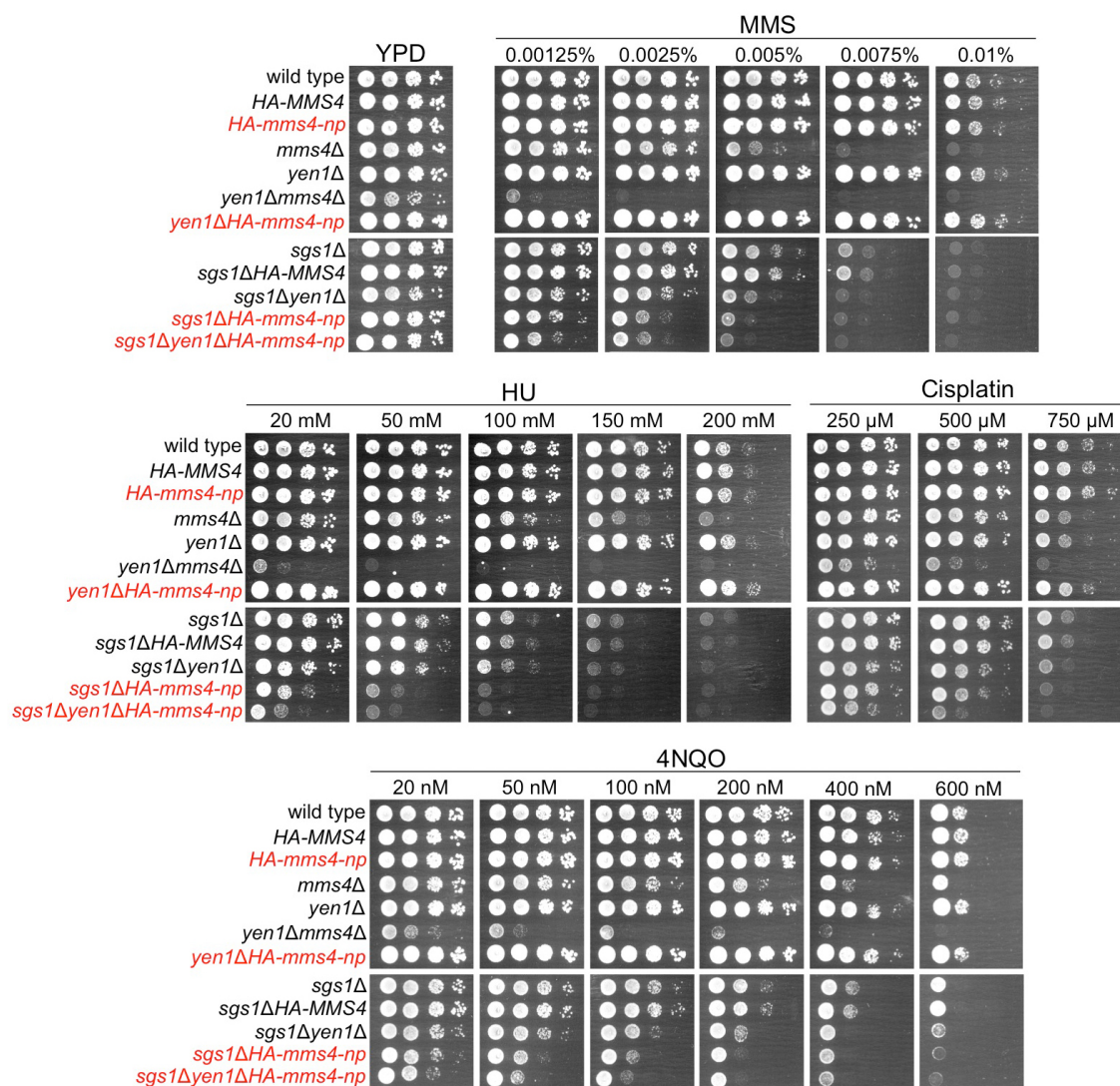


Figura R17. La deficiencia en la fosforilación de Mms4 aumenta la sensibilidad de las células que carecen de la helicasa del tipo RecQ Sgs1 a agentes que causan daño en el DNA o estrés replicativo. Se plaquearon diluciones seriadas (1/10) de cultivos logarítmicos normalizados en placas de YPD suplementadas con las cantidades indicadas de MMS, HU, cisplatino o 4NQO, y se incubaron durante 48-72 h a 30°C. Las cepas *HA-MMS4* (cepa YMV33) y *sgs1Δ HA-MMS4* (cepa YMG21), las cuales presentan la misma sensibilidad a los agentes indicados que la cepa silvestre (W303-1a) y *sgs1Δ* (cepa YMG7) respectivamente, se usaron para comprobar que el fenotipo de las células *sgs1Δ HA-mms4-np* (cepa YMG12) no se debe a la etiqueta (3HA) incorporada a la proteína Mms4. Las otras cepas utilizadas, todas ellas isogénicas, fueron: *HA-mms4-np* (YMG11); *mms4Δ* (YMG48); *yen1Δ* (YJT161); *yen1Δmms4Δ* (YMG10); *sgs1Δyen1Δ* (YMG9); *sgs1Δyen1Δ HA-mms4-np* (cepa YMG14). Se destacan en rojo las cepas que incluyen el mutante *mms4-np*.

12. La formación del complejo Mus81-Mms4 no depende de la fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4

A pesar de que, como se ha explicado previamente, la inmunoprecipitación de Mms4 a partir de cultivos asincrónicos permite obtener un complejo con actividad nucleasa (Ip *et al*, 2008), era posible que esos ensayos solo reflejaran la purificación de los complejos unidos gracias a la fosforilación de Mms4, que potencialmente podría ocurrir únicamente en aquellas células que se encontraran en G2/M. Por ello, nos preguntamos si el papel regulador de la fosforilación de Mms4 podría ejercerse sobre el propio ensamblaje del complejo, el cual se necesita para la actividad endonucleasa (Kaliraman *et al*, 2001). Para responder esta cuestión, analizamos la formación del complejo Mus81-Mms4 en condiciones en las que Mms4 se encuentra tanto fosforilada como no fosforilada (Figura R18).

Para ello, se obtuvieron extractos a partir de células *HA-MMS4 GFP-MUS81* y *HA-MUS81 GFP-MMS4* sincronizadas en G1 con factor α , en fase S con HU y en G2/M con nocodazol. En primer lugar, se comprobó la presencia de las proteínas HA-Mms4, GFP-Mus81, HA-Mus81 y GFP-Mms4 en los extractos totales, mediante inmunoblot (Figura R18A). A continuación, se inmunoprecipitaron las proteínas HA-Mms4 y HA-Mus81 a partir de una fracción de los extractos celulares anteriores y, tras ello, se analizó su presencia mediante inmunoblot, así como la potencial co-inmunoprecipitación en cada caso de GFP-Mus81 y GFP-Mms4 (Figura R18B). En todos los inmunoprecipitados de HA-Mms4, tanto en los obtenidos con proteína fosforilada como con no fosforilada, se detectó GFP-Mus81. Del mismo modo, al inmunoprecipitar HA-Mus81, se detectó GFP-Mms4 en todos los casos, tanto a partir de células sincronizadas en G1 o en fase S, condiciones en las que se detectaba la forma no fosforilada de Mms4, como a partir de células bloqueadas en G2/M, en las que Mms4 se encontraba fosforilada. Dado que en todos los ensayos las dos subunidades Mus81 y Mms4 co-inmunoprecipitaron, independientemente de la fase del ciclo celular y de la modificación de Mms4, estos resultados indican que la fosforilación de Mms4 no se requiere para la formación del complejo Mus81-Mms4. Por lo tanto, la regulación de la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 mediante la fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4 debe llevarse a cabo a través de otro mecanismo.

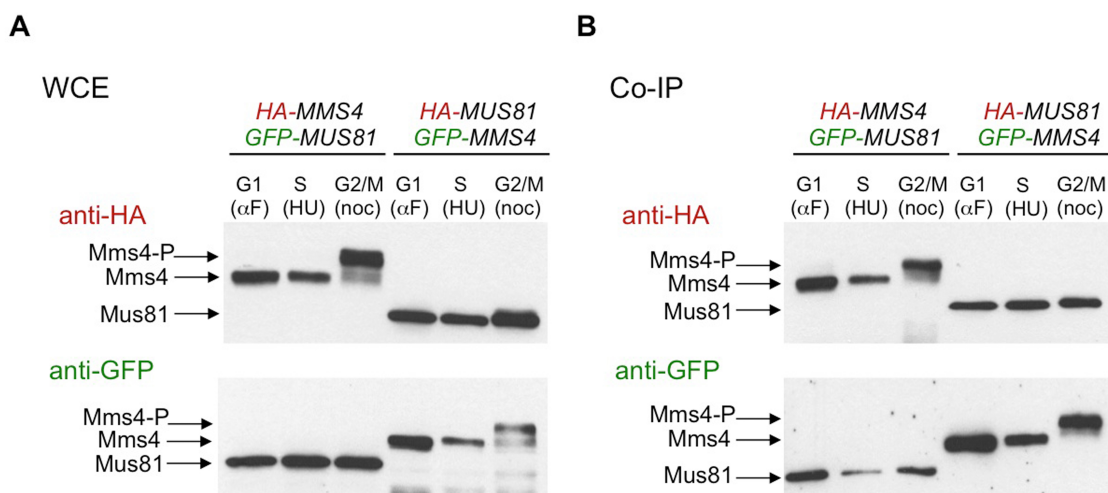


Figura R18. La formación del complejo Mus81-Mms4 no depende de la fosforilación de la subunidad no-catalítica Mms4. (A) Presencia de Mus81 y Mms4 en extractos totales. Se obtuvieron extractos a partir de células *HA-MMS4 GFP-MUS81* (cepa YSG45) y *HA-MUS81 GFP-MMS4* (cepa YSG65) sincronizadas en G1 con factor α , en fase S con HU y en G2/M con nocodazol. La presencia de las proteínas HA-Mms4, GFP-Mus81, HA-Mus81 y GFP-Mms4 en los extractos totales se analizó mediante inmunoblot. (B) Co-immunoprecipitación de Mus81 y Mms4. Las proteínas HA-Mms4 y HA-Mus81 se inmunoprecipitaron a partir de una fracción de los extractos celulares anteriores y se analizó mediante inmunoblot la co-inmunoprecipitación en cada caso de GFP-Mus81 y GFP-Mms4. En los geles se cargó en cada caso el 5% del total del inmunoprecipitado.

13. La fosforilación de Mms4 no depende de la formación del complejo Mus81-Mms4

Tras descartar que la fosforilación de Mms4 sea necesaria para la formación del complejo Mus81-Mms4, nos planteamos si, por el contrario, esta modificación requiere el ensamblaje previo de las subunidades Mus81-Mms4. Para responder esta pregunta, analizamos la fosforilación de Mms4 a lo largo del ciclo celular en ausencia de Mus81, para lo que construimos un mutante *mus81Δ HA-MMS4*. Se partió de un cultivo exponencial que se sincronizó en G1 por adición al medio de factor α . Una vez sincronizado, las células *mus81Δ HA-MMS4* se liberaron en la fase S en medio fresco (Figura R19A). La correcta progresión en el ciclo celular se monitorizó mediante citometría de flujo (Figura R19B). El análisis de Mms4 mediante inmunoblot (Figura R19C) mostró que, al igual que ocurre en células *MUS81⁺* (Figura 1D, panel inferior), Mms4 también se fosforila entre los 45 y 75 min tras la liberación en fase S en ausencia de la subunidad catalítica Mus81, una vez que las células han alcanzado un contenido de DNA 2C, eliminándose la modificación más tarde y volviéndose a fosforilar la proteína en el siguiente ciclo celular. De ello se deduce que la formación del complejo Mus81-Mms4 no es un requisito para la fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4 a lo largo del ciclo celular.

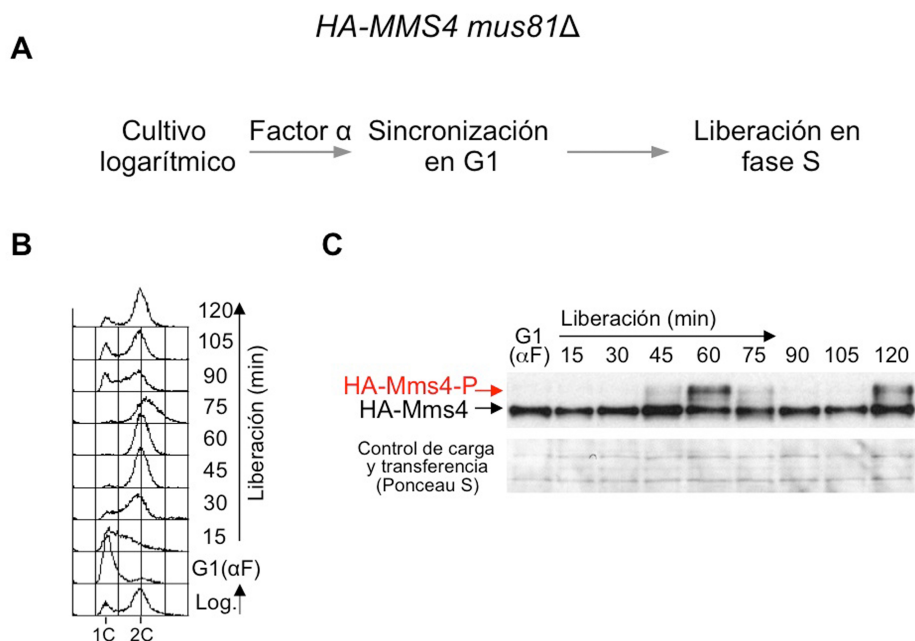


Figura R19. La fosforilación de Mms4 no depende de la formación del complejo Mus81-Mms4. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *mus81Δ HA-MMS4* (cepa YMV42) en la fase G1 con la feromona factor α y se liberaron posteriormente en la fase S. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo, a los tiempos indicados en la figura. (C) Análisis de la proteína HA-Mms4 mediante inmunoblot a lo largo del experimento. Como control de carga y transferencia se muestra la región de la membrana correspondiente a la zona de migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S.

14. La activación de Mus81-Mms4 ocurre cuando las células acaban la fase S, incluso en presencia de lesiones de DNA que interfieren con la replicación cromosómica

En nuestro grupo encontramos que Mus81-Mms4 es necesaria para que la replicación cromosómica se complete en condiciones de daño en el DNA (Vázquez, 2012) lo que ayuda a explicar la sensibilidad de las células que carecen de Mus81 o Mms4 a distintos agentes que causan lesiones en el material genético. El requerimiento de Mus81-Mms4 para completar la replicación cuando el DNA está dañado puede resultar en principio paradójico, ya que, según los resultados presentados hasta ahora en esta tesis, la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 está restringida al final de la fase S y la mitosis, siendo su actividad muy baja durante G1 y la fase S. No obstante, todos los datos presentados anteriormente sobre la regulación de Mus81-Mms4 en el ciclo celular se obtuvieron a partir de experimentos realizados en ausencia de agentes que dañan el DNA. Esto nos hizo preguntarnos si la presencia de lesiones en el DNA que interfieren con la replicación cromosómica puede inducir o modificar de alguna forma la regulación de esta endonucleasa.

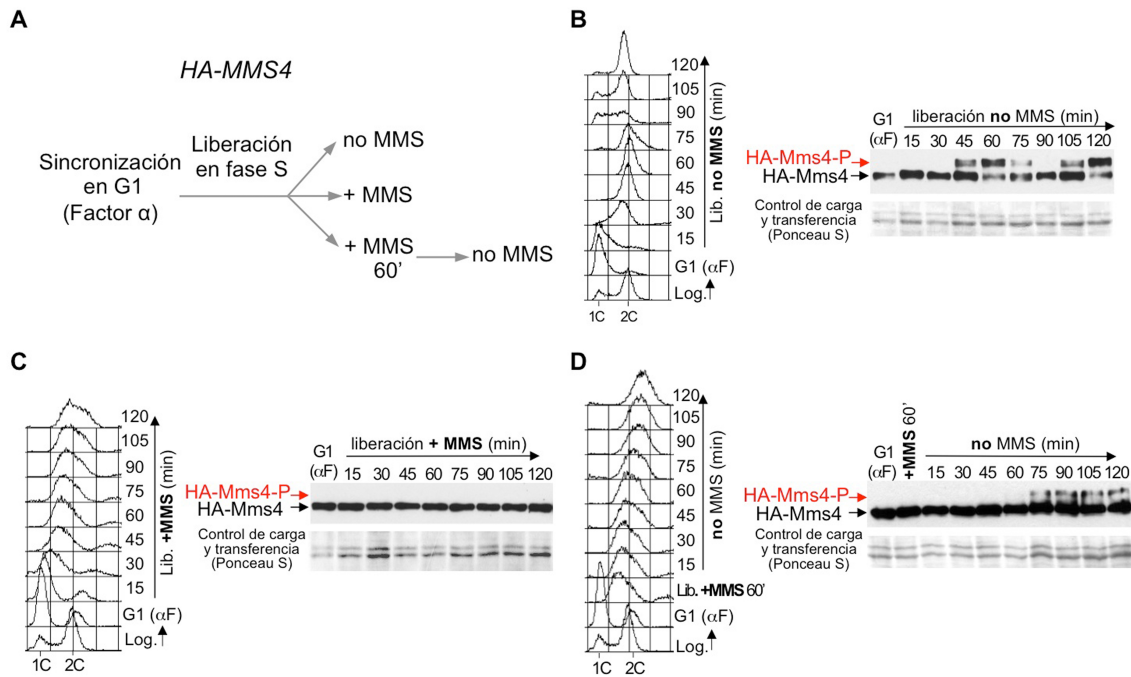


Figura R20. Mms4 únicamente se fosforila cuando las células finalizan la fase S, incluso en presencia de lesiones en el DNA que interfieren con la replicación cromosómica. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células HA-MMS4 (cepa YMV32) en la fase G1 con la feromona factor α . A continuación, el cultivo se dividió en tres: uno de ellos se liberó en fase S en ausencia de MMS (B); otro fue liberado en fase S en presencia de MMS (0,02%) (C); el tercero se liberó en fase S en presencia de MMS (0,02%) durante 60 min, tras los cuales el MMS se eliminó del medio, permitiéndose la progresión de las células en el ciclo celular (D). (B, C, D) Panel izquierdo: análisis de la progresión en el ciclo celular mediante citometría de flujo. Panel derecho: análisis de la proteína Mms4 por inmunoblot.

Para resolver esta cuestión, analizamos en primer lugar la fosforilación de Mms4 en presencia de daño en el DNA, comparándola con su patrón de fosforilación en un ciclo celular normal, en ausencia de lesiones inducidas en el material genético. Para ello se sincronizaron células HA-MMS4 en G1 con factor α y se liberaron en medio con o sin metil metanosulfonato (MMS), un agente alquilante que daña el DNA e interfiere con la replicación de los cromosomas (Figura R20A). En medio sin MMS, las células progresaron en la fase S y finalizaron el ciclo celular, según indica la citometría de flujo (Figura R20B, panel izquierdo). El análisis por inmunoblot (Figura R20B, panel derecho) mostró que Mms4 se fosforila durante el ciclo celular, como se había observado en experimentos anteriores. Así, Mms4 resultó fosforilada a los 45 min tras la liberación de G1, cuando las células habían alcanzado un contenido de DNA 2C, como muestra la variación de la movilidad electroforética de la proteína, y se desfosforiló después, cuando las células entraron en un nuevo ciclo celular. En medio con MMS, las células avanzaron despacio en la fase S como consecuencia del daño en el DNA, y no alcanzaron un contenido de DNA 2C (Figura R20C, panel izquierdo). En estas condiciones, Mms4 no presentó cambios detectables por inmunoblot, incluso tras 120 min en presencia de MMS (Figura R20C, panel derecho), tratamiento que

habría causado una reducción en la viabilidad celular y habría afectado a la replicación del DNA en ausencia de Mus81-Mms4. La ausencia de fosforilación detectable en Mms4 sugiere que Mus81-Mms4 permanece con una actividad baja durante la fase S, a pesar de la presencia de daño en el DNA. Finalmente, las células se liberaron del bloqueo en G1 en medio con MMS durante 60 min, y el MMS fue posteriormente retirado con el fin de que el cultivo pudiera recuperarse y las células pudieran progresar a través del ciclo celular (Figura R20A). La fosforilación de Mms4 se detectó 75 min después de la retirada del MMS (Figura 20D, panel derecho), cuando la mayoría de las células mostraban un contenido en DNA 2C (Figura 20D, panel izquierdo), lo cual sugiere que Mus81-Mms4 se activa únicamente al final de la fase S o en G2/M, a pesar de la presencia previa de daño en el DNA. En conjunto, estos resultados indican que la fosforilación de Mms4 no se induce por daño en el DNA y ocurre únicamente cuando las células finalizan la fase S.

Para confirmar que las lesiones en el DNA durante la fase S no inducen la activación de Mus81-Mms4, llevamos a cabo ensayos de actividad nucleasa (Figura R21). Para ello, se partió de un cultivo exponencial de células *HA-MMS4* que se sincronizó en G1 y se dividió a continuación en tres partes: una de ellas se liberó en medio sin MMS durante 20 min (células en fase S, sin daño en el DNA), otra parte se liberó en medio sin MMS, pero con nocodazol durante 60 min (células en G2/M, sin daño en el DNA), y la tercera se liberó en medio con MMS durante 60 min (células en fase S, daño en el DNA) (Figura R21A). En el último tratamiento, el MMS se eliminó posteriormente para permitir a las células progresar en el ciclo celular durante 120 min y alcanzar un contenido de DNA 2C. La progresión en el ciclo celular se analizó en cada caso por citometría de flujo (Figura R21B) y microscopía. Como muestra el inmunoblot (Figura R21C), Mms4 no resultó fosforilada en células que se encontraban en fase S, independientemente de haber sido tratadas o no con MMS, de acuerdo con los datos obtenidos en la Figura R20. Sin embargo, cuando las células tratadas con MMS se liberaron de esta droga y alcanzaron el final de la fase S, Mms4 resultó fosforilada, de acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 20 y al igual que ocurre en las células bloqueadas en G2/M usadas como control. En todos los casos, HA-Mms4 se inmunoprecipitó a partir de los extractos celulares (Figura R21C) para analizar la actividad nucleasa (Figura 21D). Para estos ensayos, se usaron dos estructuras sintéticas que son sustratos de Mus81-Mms4 y se generan durante la replicación del DNA o la reparación asociada a replicación: una horquilla de replicación modelo y un 3'-*flap*, ambas marcadas con P³². La Figura 21C muestra que la actividad nucleasa de Mus81-Mms4 sobre ambos sustratos, determinada por la aparición de productos marcados, solo fue alta cuando Mms4 se inmunoprecipitó a partir de

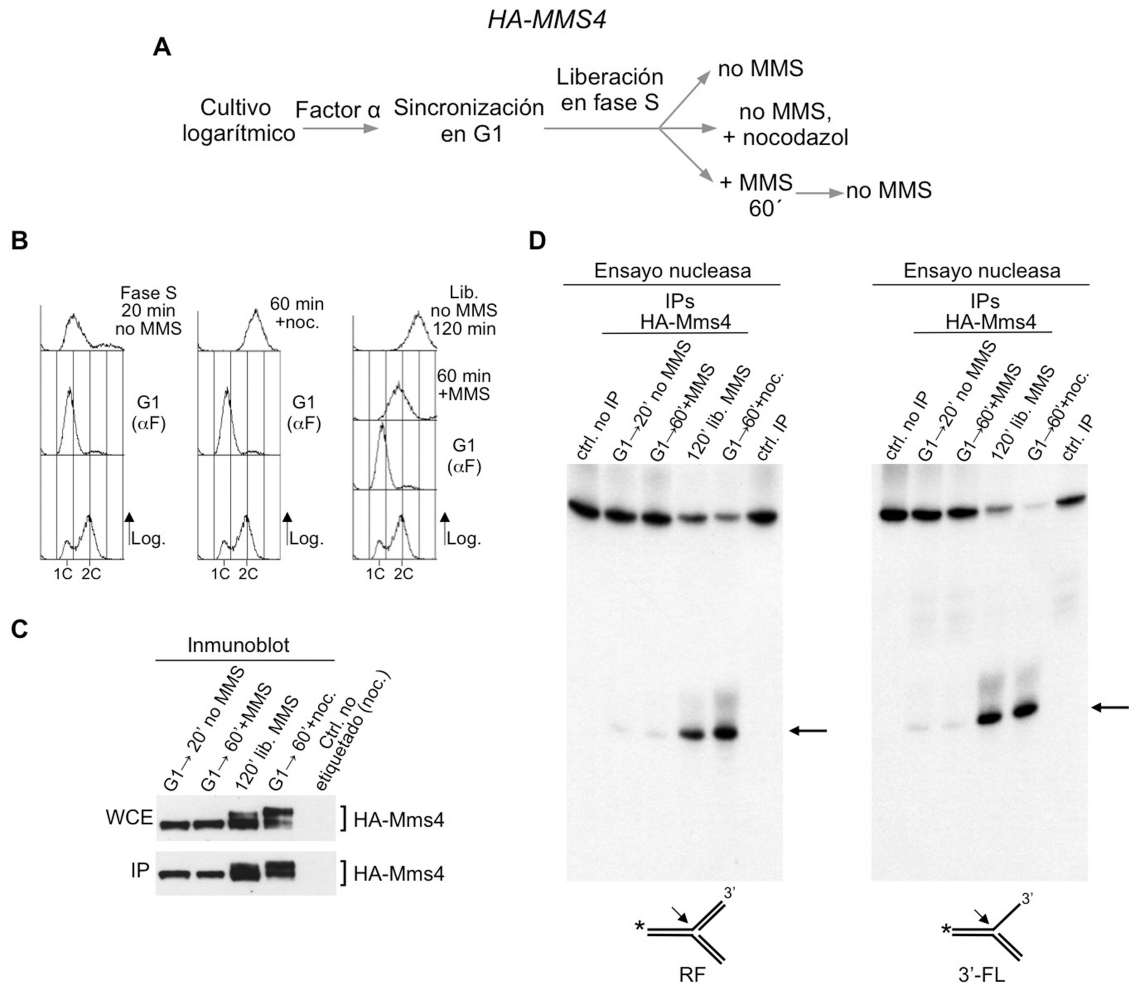


Figura R21. La activación de Mus81-Mms4 no se induce por la presencia de daño en el DNA y solo ocurre cuando las células finalizan la fase S. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células HA-MMS4 (cepa YMV33) en G1 con la feromona factor α . A continuación, el cultivo se dividió en tres: uno de ellos se liberó en medio sin MMS durante 20 min; otro cultivo se liberó en medio sin MMS, con nocodazol, durante 60 min; el tercer cultivo se liberó en fase S en presencia de MMS (0,02%), durante 60 min, y el MMS fue eliminado a continuación, permitiéndose la progresión de las células en el ciclo celular. **(B)** La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo. **(C)** Se obtuvieron muestras de cultivo a los tiempos indicados y se prepararon extractos celulares a partir de los que se purificó HA-Mms4 por inmutaafinidad. La proteína Mms4 presente en los extractos celulares totales (WCE) se analizó mediante inmunoblot, así como el rendimiento de la inmunoprecipitación (IP). En los geles se cargó aproximadamente el 2% de la cantidad total de proteína inmunoprecipitada usada para el ensayo nucleasa. **(D)** Los ensayos nucleasa se llevaron a cabo usando como sustratos una horquilla de replicación modelo (RF) (panel izquierdo) y un 3'-flap (3'-FL) (panel derecho). La flecha indica los productos resultantes de la escisión nucleolítica de cada sustrato. Se incluyeron dos tipos de control: ensayos nucleasa con extractos proteicos inmunoprecipitados a partir de células no etiquetadas bloqueadas en G2/M y reacciones llevadas a cabo en ausencia de extracto proteico.

extractos procedentes de células que habían finalizado la fase S tras el tratamiento con MMS. Esta actividad fue similar a la de Mus81-Mms4 procedente de células bloqueadas en G2/M que no habían sido sometidas a daño en el DNA previamente. Sin embargo, cuando Mms4 se inmunoprecipitó a partir de células en fase S tratadas con MMS, o bien a partir de células en fase S no tratadas, la actividad nucleasa

detectada fue muy baja (Figura R21D). Estos resultados muestran que, si bien Mus81-Mms4 es necesaria para hacer frente a las lesiones en el DNA originadas durante la fase S por MMS, el daño en el DNA no induce la activación de la nucleasa. Su actividad completa queda restringida hasta que las células finalizan la mayor parte de la replicación, como ocurre en un ciclo celular normal en ausencia de lesiones en el material genético. Todo ello indica que su ventana de actuación en el ciclo celular es suficiente para garantizar que la replicación de los cromosomas se complete bajo condiciones de daño en el DNA.

15. La ausencia de Sgs1 o Yen1 no tiene efecto sobre la regulación de Mus81-Mms4

Como se ha mencionado previamente, Mus81-Mms4 solapa funcionalmente con Sgs1/Top3/Rmi1 y se requiere para la supervivencia celular en ausencia de este complejo helicasa RecQ. Es posible que una gran parte de los sustratos comunes a Mus81-Mms4 y Sgs1/Top3/Rmi1 se resuelvan por disolución por el segundo, pero necesiten procesarse por Mus81 cuando el complejo RecQ no esté presente o no pueda funcionar. De hecho, algunos intermediarios de DNA que persisten después del tratamiento con MMS en células deficientes en Rmi1 o en ausencia de Sgs1 pueden ser eliminados por Mus81-Mms4 (Ashton *et al*, 2011; Szakal y Branzei, 2013). Además, como se muestra en la Figura R17, la sensibilidad de las células *sgs1Δ* a determinados agentes genotóxicos como el MMS aumenta cuando Mus81-Mms4 no tiene actividad completa. Como ya se ha mencionado, Mus81-Mms4 presenta también función solapante con la resolvasa Yen1 durante la reparación del DNA, y las células que carecen de Mus81 y Yen1 muestran hipersensibilidad a agentes que originan daño en el DNA. Debido a estas relaciones funcionales, nos preguntamos si la ausencia de Sgs1-Top3-Rmi1 y Yen1 tendría un efecto sobre la regulación de Mus81-Mms4, ya que sería posible que esta endonucleasa fuera requerida en estas condiciones patológicas en momentos del ciclo celular en los que normalmente no es necesaria.

Para analizar esta cuestión, utilizamos células *sgs1ΔHA-MMS4*, que se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio con o sin MMS (Figura R22A). La citometría de flujo indica que estas células progresaron normalmente en la fase S en ausencia de la droga y lentamente cuando se expusieron al MMS (Figura R22B, panel izquierdo). El análisis por inmunoblot (Figura R22B, panel derecho) mostró que, en ausencia de MMS, la fosforilación de Mms4 dependiente de ciclo celular ocurriría como en células *SGS1⁺* (Figura 20B). Asimismo, al igual que en células *SGS1⁺* (Figura

R20C), Mms4 no mostró cambios en la migración electroforética cuando las células *sgs1Δ* se trataron con MMS en la fase S.

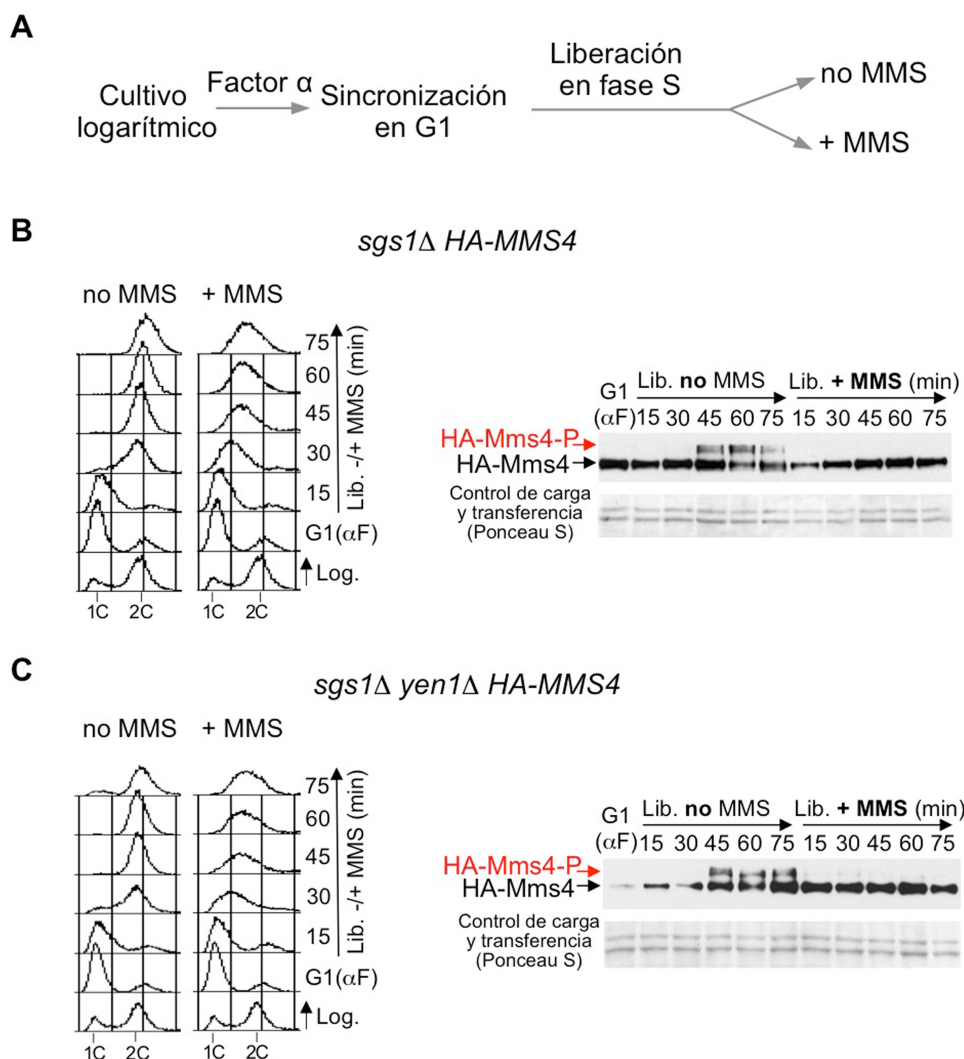


Figura R22. La ausencia de Sgs1 y Yen1 no modifica el patrón de fosforilación de Mms4 en el ciclo celular. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *sgs1Δ HA-MMS4* (cepa YMG21) (B) y *sgs1Δyen1Δ HA-MMS4* (cepa YSG56) (C) en la fase G1 con la feromona factor α y a continuación se liberaron en la fase S, en presencia y ausencia de MMS (0,02%). (B, C) Panel izquierdo: análisis de la progresión en el ciclo celular mediante citometría de flujo. Panel derecho: análisis de la proteína Mms4 por inmunoblot.

Analizamos también la fosforilación de Mms4 bajo las mismas condiciones en células *sgs1Δyen1Δ HA-MMS4* (Figura R22C). Tras la sincronización en G1 y la posterior liberación en medio con o sin MMS, estas células progresaron en la fase S de manera similar a las células *SGS1⁺YEN1⁺* (Figura R20B-C) y a las *sgs1Δ* (Figura R22B), tanto en presencia como en ausencia del agente alquilante (Figura R22C, panel izquierdo). El análisis por inmunoblot (Figura R22C, panel derecho) mostró que cuando las células *sgs1Δyen1ΔHA-MMS4* no se expusieron al MMS, la fosforilación

de Mms4 ocurría como en células *SGS1⁺YEN1⁺* (Figura R20B), mientras que Mms4 no presentó cambios en su movilidad electroforética indicativos de fosforilación cuando las células se trataron con MMS durante la fase S, al igual que en células *SGS1⁺YEN1⁺* (Figura R20C). Estos resultados indican que la ausencia de Sgs1 o Yen1 no provoca cambios en la dinámica de fosforilación de esta endonucleasa, incluso en presencia de daño en el DNA durante la replicación cromosómica. Estos datos muestran también que la hiperfosforilación de Mms4 no está incrementada en células carentes de Sgs1 con respecto a células *SGS1⁺*, al contrario de lo que ocurre con la fosforilación de Eme1^{Mms4} en *Schizosaccharomyces pombe* (Dehe *et al*, 2013). Asimismo, la fosforilación de Mms4 no se incrementa tampoco en células que carecen de Sgs1 y Yen1 al mismo tiempo (comparar Figuras R20B y R22C).

A continuación, para confirmar los resultados anteriores, analizamos la actividad nucleasa de Mus81-Mms4 en los mutantes *sgs1Δ* y *sgs1Δyen1Δ* (Figura R23). Para ello, se sincronizaron células *sgs1Δ HA-MMS4* y *sgs1Δyen1Δ HA-MMS4* en G1 y se liberaron durante 60 min, tanto en presencia de MMS (células en fase S, con daño en el DNA), como en ausencia de MMS, pero con nocodazol (células en G2/M, sin daño en el DNA) (Figura R23A). La progresión en el ciclo celular se analizó por citometría de flujo (Figura R23B) y microscopía. El análisis por inmunoblot (Figura R23C) mostró que Mms4 no se hiperfosforilaba en extractos de células en fase S tratadas con MMS, lo que concuerda con los datos mostrados en las Figura R20 y R22. Por el contrario, Mms4 se hiperfosforilaba en ambas cepas en G2/M. En ambos casos, HA-Mms4 se inmunoprecipitó a partir de extractos celulares (Figura R23C) y se analizó su actividad nucleasa. La Figura R23D muestra que, tanto en la cepa *sgs1Δ* como en *sgs1Δyen1Δ*, la actividad nucleasa de Mus81-Mms4 fue muy baja cuando el complejo se inmunoprecipitó a partir de extractos obtenidos de células en fase S tratadas con MMS. Sin embargo, cuando Mms4 se inmunoprecipitó a partir de extractos obtenidos de células sincronizadas en G2/M, la actividad de Mus81-Mms4 fue mucho mayor, como indica la aparición de una cantidad significativa de productos marcados procedentes de los sustratos utilizados. Por tanto, el modo de regulación de Mus81-Mms4 no se altera aparentemente en células carentes de Sgs1 y Yen1, incluso en presencia de daño en el DNA durante la fase S. Así, incluso cuando la función de Mus81-Mms4 adquiere mayor relevancia en la respuesta al daño en el DNA a consecuencia de la ausencia de Sgs1 (Figura R17), esta endonucleasa no se activa hasta que la replicación de la mayor parte del DNA se ha completado.

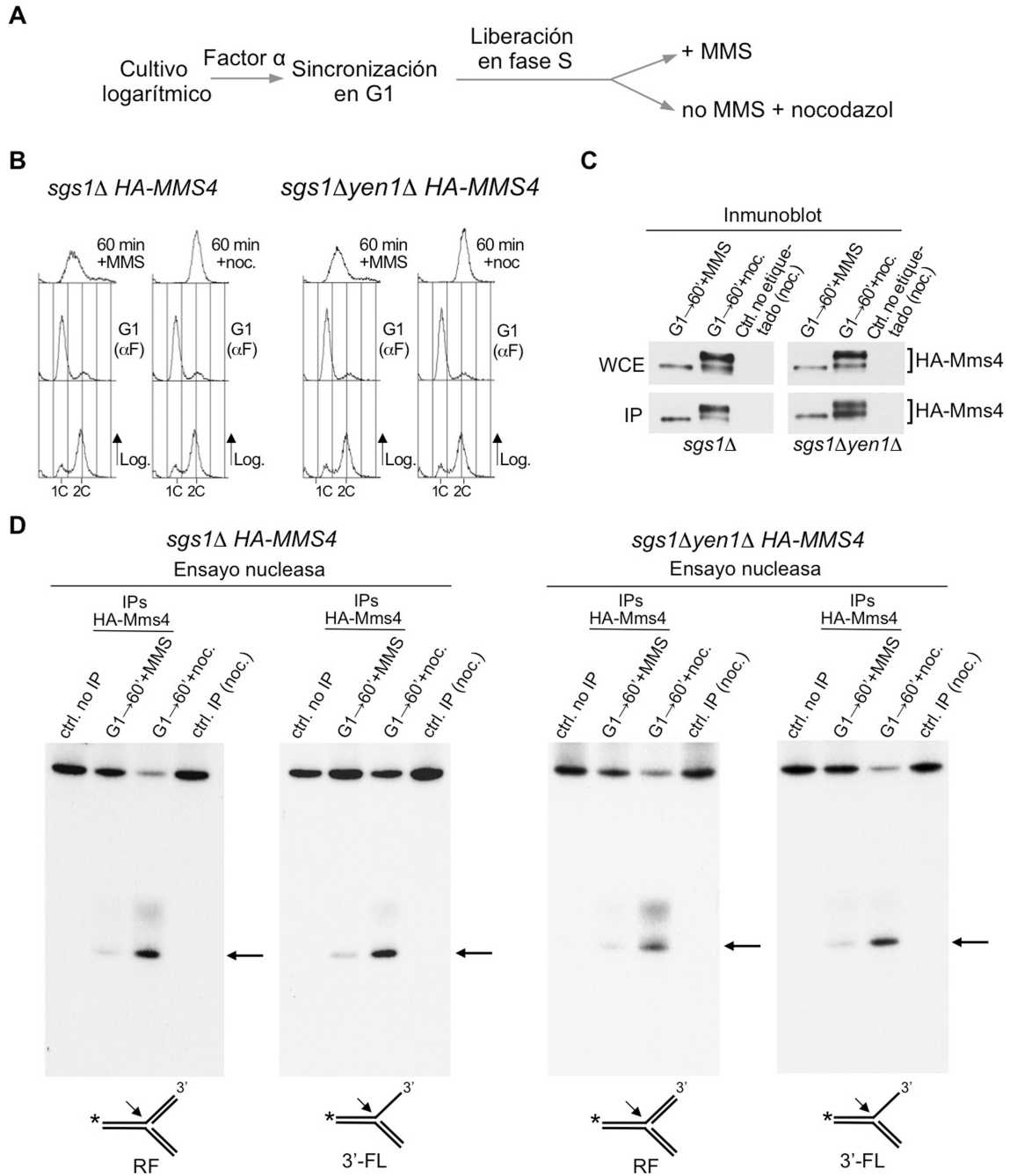


Figura R23. La ausencia de Sgs1 y Yen1 no altera el modo de activación del complejo Mus81-Mms4. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *sgs1* Δ HA-MMS4 (cepa YMG21) y *sgs1* Δ *yen1* Δ HA-MMS4 (cepa YSG56) en G1 con la feromona factor α . A continuación, el cultivo se dividió en dos: una de ellos se liberó en medio con MMS (0,02%) durante 60 min, y el otro se liberó en medio sin MMS, con nocodazol. (B) La progresión de las células en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo. (C) Se obtuvieron muestras de cultivo a los tiempos indicados y se prepararon extractos celulares a partir de los que se purificó HA-Mms4 por inmunoprecipitación. La proteína Mms4 presente en los extractos celulares totales (WCE) se analizó mediante inmunoblot, así como el rendimiento de la inmunoprecipitación (IP). En los geles se cargó aproximadamente el 2% de la cantidad total de proteína inmunoprecipitada usada para el ensayo nucleasa. (D) Los ensayos nucleasa se llevaron a cabo usando como sustratos una horquilla de replicación modelo (RF) (paneles izquierdos en cada caso) y un 3'-flap (3'-FL) (paneles derechos). La flecha indica los productos resultantes de la escisión nucleolítica de cada sustrato. Se incluyeron dos tipos de control: ensayos nucleasa con extractos proteicos inmunoprecipitados a partir de células no etiquetadas bloqueadas en G2/M y reacciones llevadas a cabo en ausencia de extracto proteico.

16. Las células deficientes en el *checkpoint* de la fase S no pueden prevenir la actividad de Mus81-Mms4 durante la replicación cromosómica bajo condiciones de daño en el DNA

Todos los resultados mostrados hasta ahora indican que la estricta regulación de Mus81-Mms4 limita su actividad a un corto periodo del ciclo celular, de manera que la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 es muy baja durante la fase S y solo se activa cuando la mayor parte de la replicación cromosómica se ha completado, aun en presencia de daño en el DNA o en ausencia de la helicasa Sgs1. Dado que la replicación cromosómica bajo condiciones de daño en el DNA o estrés replicativo está en gran parte controlada por el *checkpoint* de la fase S, mediado por las quinasas Mec1 y Rad53 (Lopes *et al*, 2001; Paulovich y Hartwell, 1995; Tercero y Diffley, 2001; Tercero *et al*, 2003), nos preguntamos si este mecanismo de vigilancia podría tener algún papel en la prevención de la activación de Mus81-Mms4 durante la fase S. Para abordar esta cuestión, analizamos la actividad de Mus81-Mms4 bajo condiciones de daño en el DNA en células carentes de Rad53, llevando a cabo el mismo tipo de experimentos descritos en los apartados anteriores.

Para realizar estos experimentos, se partió de un cultivo exponencial de células *rad53Δ HA-MMS4*, que se sincronizaron en la fase G1 con factor α y se liberaron en medio con o sin MMS (Figura R24A). En medio sin MMS, las células *rad53Δ HA-MMS4* progresaron en el ciclo celular normalmente, según indica la citometría de flujo (Figura R24B, panel izquierdo). El análisis por inmunoblot (Figura R24B, panel derecho) muestra que Mms4 se fosforila en estas células a lo largo del ciclo celular con un patrón similar al encontrado en experimentos mostrados anteriormente, modificándose a partir de los 45 min de la liberación del bloqueo en G1 en el primer ciclo celular y aproximadamente a los 120 min en el segundo ciclo. Cuando las células *rad53Δ HA-MMS4* se liberaron desde G1 en medio con MMS progresaron rápidamente en la fase S a pesar de la existencia de daño en el DNA, según indica la citometría de flujo (Figura R24C, panel izquierdo) por ser deficientes en el *checkpoint* de la fase S y a pesar de no haber completado la replicación del DNA (Tercero y Diffley, 2001). A diferencia de lo que ocurre en células *RAD53⁺* bajo las mismas condiciones experimentales (Figuras R20 y R22), y según muestra el inmunoblot (Figura R24C, panel derecho), Mms4 se fosforila a los 60 min de la liberación del bloqueo en G1, a pesar de la presencia de MMS en el medio de cultivo. De igual modo que en experimentos anteriores, las células también se liberaron del bloqueo en G1 en medio con MMS durante 60 min, tras lo que la droga se eliminó (Figuras R24A y R24D). En este caso, a diferencia de lo encontrado en células *RAD53⁺* (Figura R20),

Mms4 resultó fosforilada tras el tratamiento de 60 min con MMS (Figura R24D), de acuerdo con lo mostrado en la Figura R24C, permaneciendo modificada durante el resto del experimento. Todos estos resultados indican que, en ausencia de un *checkpoint* de la fase S funcional, las células no pueden prevenir la fosforilación de Mms4 durante la replicación de sus cromosomas cuando el DNA está dañado y, consecuentemente, no pueden evitar la activación prematura de Mus81-Mms4.

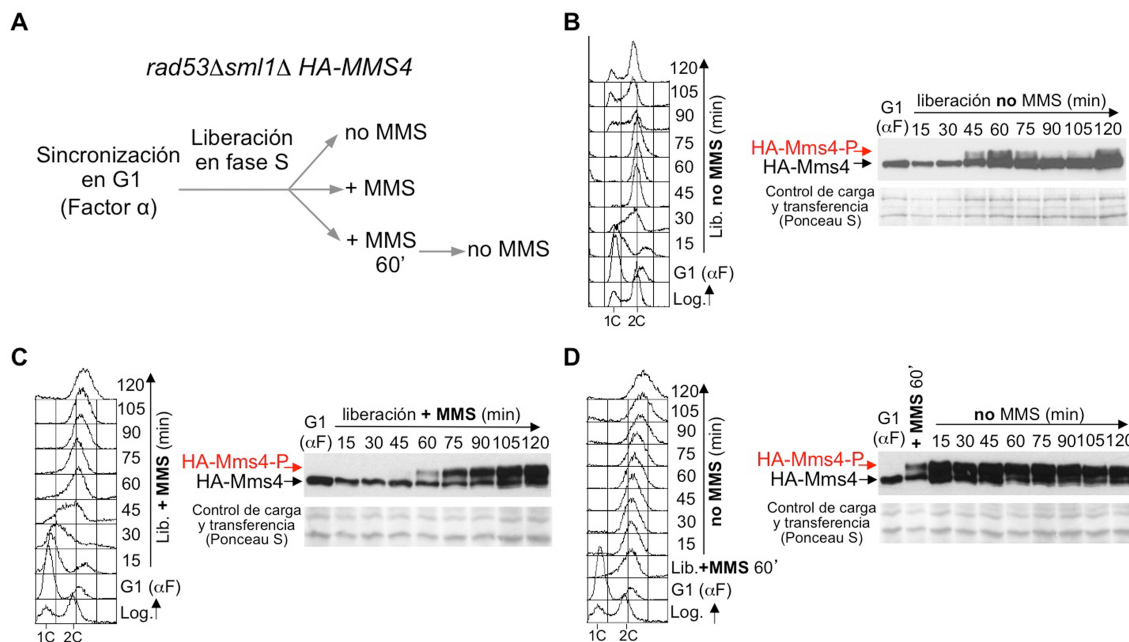


Figura R24. Las células deficientes en el *checkpoint* de la fase S no pueden prevenir la fosforilación de Mms4 durante la replicación cromosómica bajo condiciones de daño en el DNA. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *rad53Δsml1Δ HA-MMS4* (cepa YMV38) en la fase G1 con la feromona factor α . A continuación, el cultivo se dividió en tres: uno de ellos se liberó en fase S en ausencia de MMS (B); otro fue liberado en la fase S en presencia de MMS (0,02%) (C); el tercero se liberó en fase S en presencia de MMS durante 60 min, tras lo que el MMS se eliminó del medio, permitiéndose la progresión de las células en el ciclo celular (D). (B, C, D) Panel izquierdo: análisis de la progresión en el ciclo celular mediante citometría de flujo. Panel derecho: análisis de la proteína Mms4 por inmunoblot).

Para confirmar que la fosforilación prematura de Mms4 en las células *rad53Δ* se corresponde con la adquisición de actividad nucleasa por el complejo Mus81-Mms4, realizamos ensayos de actividad nucleasa (Figura R25). Para ello utilizamos células *rad53Δ HA-MMS4*, *RAD53⁺ HA-MMS4* y una cepa control con Mms4 sin etiquetar. Estas células se sincronizaron en G1 y se liberaron en la fase S en medio con o sin MMS, durante 60 min (Figura R25A). En el caso de la liberación en medio sin MMS, se añadió nocodazol, para bloquear a las células en G2/M, cuando la actividad de Mus81-Mms4 es máxima. La progresión en el ciclo celular se siguió por citometría de flujo (Figura R25B) y microscopía.

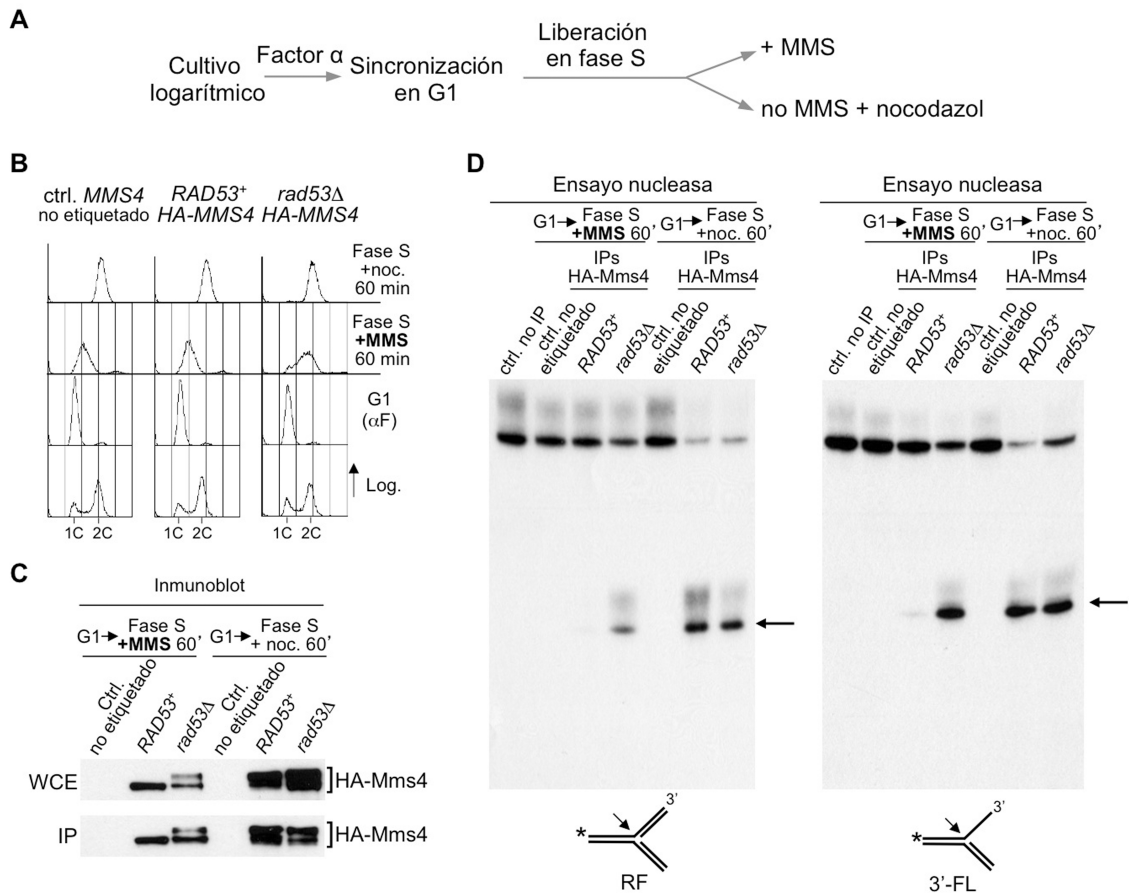


Figura R25.- Las células deficientes en el checkpoint de la fase S no pueden prevenir la actividad de Mus81-Mms4 durante la replicación cromosómica bajo condiciones de daño en el DNA. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *rad53Δsmi1Δ HA-MMS4* (cepa YMV38) en G1 con la feromona factor α . A continuación, el cultivo se dividió en dos: uno de ellos se liberó en medio con MMS (0,02%) durante 60 min, y el otro se liberó en medio sin MMS, con nocodazol. (B) La progresión en el ciclo celular a lo largo del experimento se analizó determinando el contenido de DNA mediante citometría de flujo. (C) Se obtuvieron muestras de cultivo a los tiempos indicados, y se prepararon extractos celulares a partir de los que se purificó HA-Mms4 por inmutafinidad. La proteína Mms4 presente en los extractos celulares totales (WCE) se analizó mediante inmunoblot, así como el rendimiento de la inmunoprecipitación (IP). En los geles se cargó aproximadamente el 2% de la cantidad total de proteína inmunoprecipitada usada para el ensayo nucleasa. (D) Los ensayos nucleasa se llevaron a cabo usando como sustratos una horquilla de replicación modelo (RF) (panel izquierdo) y un 3'-flap (3'-FL) (panel derecho). La flecha indica los productos resultantes de la escisión nucleolítica de cada sustrato. Se incluyeron dos tipos de control: ensayos nucleasa con extractos proteicos inmunoprecipitados a partir de células no etiquetadas bloqueadas en G2/M y reacciones llevadas a cabo en ausencia de extracto proteico.

El análisis por inmunoblot (Figura R25C) mostró que Mms4 se encontraba fosforilada en las células *RAD53+* y *rad53Δ* bloqueadas en G2/M con nocodazol. Sin embargo, tras el tratamiento de 60 min con MMS Mms4 solo resultó fosforilada en las células *rad53Δ*. En todos los casos, Mms4 se inmunoprecipitó a partir de los extractos totales (Figura R25C) y se utilizó en los ensayos de actividad nucleasa (Figura R25D). Para estos ensayos, como en experimentos anteriores, se usaron dos estructuras sintéticas como sustratos de Mus81-Mms4: una horquilla de replicación modelo y un

3'-*flap*, ambas marcadas con P³². La Figura R25 muestra la existencia de una alta actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 frente a ambos sustratos, determinada por la aparición de productos marcados, cuando Mms4 se inmunoprecipitó a partir de extractos obtenidos de células *rad53Δ* tratadas con MMS, pero no cuando la proteína se obtuvo a partir de células *RAD53*⁺ expuestas a MMS, lo que se correlaciona con el estado de fosforilación de Mms4 (Figura R25C). Esta alta actividad nucleasa fue similar a la encontrada para Mus81-Mms4 procedente de células *rad53Δ* o *RAD53*⁺ no tratadas con MMS y bloqueadas en G2/M (Figura R25D). Todos estos resultados muestran que la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 no puede prevenirse bajo condiciones de daño en el DNA en células deficientes en el *checkpoint* de la fase S, aunque no hayan terminado la replicación de sus cromosomas. Por lo tanto, directa o indirectamente, el *checkpoint* de la fase S contribuye a la prevención de la actividad de Mus81-Mms4 durante la replicación cromosómica.

DISCUSIÓN

La endonucleasa específica de estructura Mus81-Mms4/EME1 tiene un importante papel en la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad del genoma en las células eucarióticas (Ciccia *et al*, 2008; Dehe y Gaillard, 2017; Osman y Whitby, 2007; Rass, 2013; Schwartz y Heyer, 2011). Esta función se ejerce gracias a su capacidad para resolver mediante corte nucleolítico estructuras ramificadas de DNA que se generan especialmente durante la reparación asociada a la replicación del material genético. Las características de estas estructuras y la actividad nucleolítica de Mus81-Mms4/EME1 hacen que esta endonucleasa pueda considerarse no obstante un arma de doble filo: por un lado, su función es importante para preservar la estabilidad genómica; por otro, la actividad desregulada de esta enzima durante la fase S podría llevar a la incorrecta escisión de intermediarios de DNA durante la replicación cromosómica y provocar, consecuentemente, inestabilidad del genoma. Por ello, es esencial mantener la función nucleolítica de esta endonucleasa bajo un estricto control que permita una actuación eficiente de la misma cuando sea necesaria y, al mismo tiempo, impida su acción cuando esta pueda ser perjudicial para las células. En esta tesis hemos contribuido a establecer un mecanismo regulador para Mus81-Mms4 que ayuda a entender el funcionamiento de este complejo nucleasa *in vivo*. Así, utilizando *S. cerevisiae* como organismo modelo, hemos mostrado que la función de Mus81-Mms4 está estrictamente regulada durante el ciclo celular mitótico mediante la fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4, modificación que es necesaria para la actividad endonucleasa del complejo.

1. Mms4, la subunidad no catalítica del complejo Mus81-Mms4, se fosforila durante el ciclo celular, y esta modificación depende de Cdc28 (CDK) y Cdc5 (PLK)

El análisis de las proteínas Mus81 y Mms4 que hemos llevado a cabo ha mostrado que mientras que Mus81, la subunidad catalítica del complejo Mus81-Mms4, no presenta cambios significativos a lo largo del ciclo celular mitótico, la subunidad no catalítica Mms4 experimenta una fosforilación dependiente de la progresión de las células en el ciclo celular (Figura D1). El estudio de la fosforilación de Mms4 en células bloqueadas en G2/M y en el mutante condicional *cdc15-2* nos ha permitido determinar que esta modificación postraducciona tiene lugar en el periodo del ciclo celular comprendido entre el final de la fase S y la segregación cromosómica y, además, que se mantiene durante toda la mitosis. Dado que la fosforilación de Mms4 no se detecta en células que se encuentran en la fase G1, los resultados obtenidos indican también que debe revertirse entre telofase y G1.

Mms4 había sido previamente identificada como una de las posibles dianas de Cdc28 (Ubersax *et al*, 2003), la quinasa dependiente de ciclina que dirige la progresión en el ciclo celular en *S. cerevisiae*. En esta tesis, usando el mutante condicional *cdc28-td*, hemos mostrado que la fosforilación de Mms4 observada depende de Cdc28 (Figura D1). Nuestros resultados también han indicado que un mutante de Mms4 carente de sitios consenso de fosforilación por CDK no se fosforila. Todo ello sugiere firmemente que Mms4 es un sustrato directo de Cdc28.

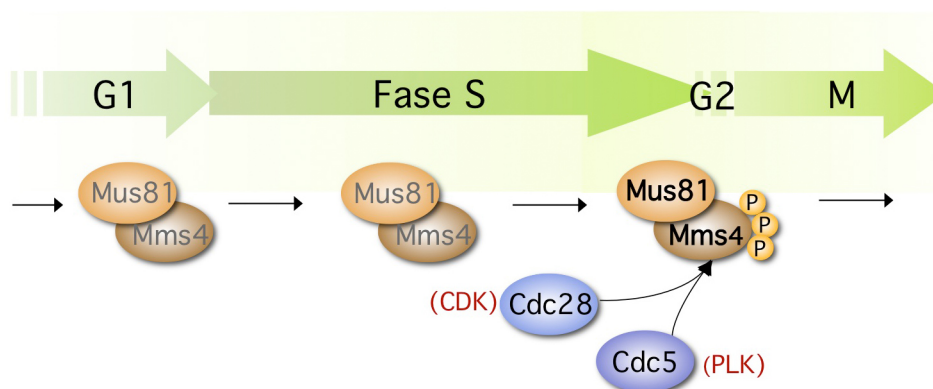


Figura D1. Fosforilación de Mms4 en el ciclo celular. La subunidad no catalítica de la endonucleasa Mus81-Mms4 se fosforila en un periodo del ciclo celular comprendido entre el final de la fase S y la segregación cromosómica. Esta modificación depende de las quinasas Cdc28 (CDK) y Cdc5 (PLK).

Además de sitios consenso de fosforilación por CDK, Mms4 contiene potenciales sitios de acoplamiento para quinasas del tipo Polo (Elia *et al*, 2003a; Elia *et al*, 2003b), los cuales solapan con tres de los anteriores. Los resultados que hemos obtenido usando un mutante condicional *cdc5-1* indican que la quinasa del tipo Polo Cdc5 también es necesaria para la fosforilación de Mms4 durante el ciclo celular (Figura D1). La implicación de Cdc5 en la modificación de Mms4 no es simplemente una consecuencia indirecta del requerimiento de esta quinasa para la progresión en la mitosis, dado que, como hemos mostrado, esta subunidad ya está fosforilada en células bloqueadas en G2/M. En conjunto, los datos obtenidos, que demuestran el papel de Cdc28 y Cdc5 en la modificación de Mms4, sugieren que Cdc28 fosforila esta subunidad del complejo Mus81-Mms4, facilitando con ello su posterior fosforilación por Cdc5. Alternativamente, o adicionalmente, Cdc28 podría fosforilar y activar Cdc5 (Mortensen *et al*, 2005; Ubersax *et al*, 2003), permitiendo así la fosforilación de Mms4 por esta quinasa (Figura D2).

Con respecto a la función de Cdc28 en la fosforilación de Mms4, uno de los aspectos que hemos analizado ha sido el papel que tienen en este proceso las distintas ciclinas con las que esta CDK puede asociarse. Los datos obtenidos utilizando los mutantes *clb1Δclb2-Vlclb3Δclb4Δ* y *clb5Δclb6Δ* han indicado que tanto

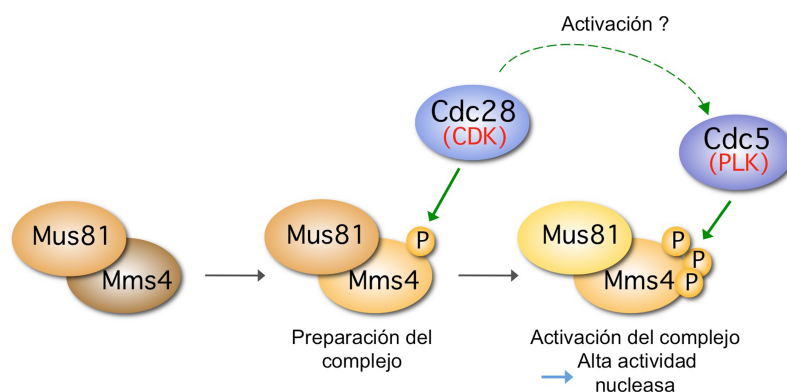


Figura D2. Fosforilación de Mms4 por Cdc28 y Cdc5. La quinasa dependiente de ciclina Cdc28 podría fosforilar Mms4, preparando esta subunidad para su posterior fosforilación por la quinasa del tipo Polo Cdc5. Cdc28 podría también activar Cdc5 permitiendo su actuación sobre Mms4.

las ciclinas de la fase S como las ciclinas mitóticas pueden permitir la participación de Cdc28 en la fosforilación de Mms4. Dado que en ausencia de las ciclinas mitóticas (Clb1-4) Mms4 se fosforila, y puesto que las ciclinas de la fase S (Clb5, Clb6) actúan en el ciclo celular antes que las anteriores, puede deducirse que en situaciones normales Cdc28 se asociaría con esta última para fosforilar Mms4. No obstante, el hecho de que Mms4 pueda fosforilarse también cuando Clb5 y Clb6 no están presentes indica que estas pueden sustituirse por las ciclinas mitóticas, y que por tanto no existe especificidad en las ciclinas que Cdc28 necesita para modificar la subunidad no catalítica de la endonucleasa. Por otra parte, en esta tesis hemos mostrado además que se puede inducir la fosforilación prematura de Mms4 adelantando la expresión de Cdc5 a fase S temprana. Este resultado confirma la implicación de Cdc5 en la fosforilación de Mms4, y además refuerza las conclusiones de participación de las ciclinas de la fase S en la modificación de esta proteína por Cdc28, ya que son las que están presentes cuando se induce la copia extra del gen *CDC5*.

2. La fosforilación de Mms4 es necesaria para la actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4

Los ensayos de actividad nucleasa llevados a cabo en esta tesis han mostrado que la fosforilación de Mms4 dependiente del ciclo celular se requiere para la completa actividad del complejo Mus81-Mms4. Los resultados obtenidos indican que esta fosforilación permite a la endonucleasa Mus81-Mms4 escindir una gran variedad de estructuras de DNA ramificadas que pueden generarse en distintas situaciones durante la replicación cromosómica, incluyendo horquillas de replicación. Nuestros datos revelan además que la fosforilación de Mms4 y la consiguiente activación de Mus81-Mms4 sólo ocurren durante un periodo limitado del ciclo celular, una vez que

las células han finalizado la síntesis de la mayor parte del DNA, pero previamente a su progresión en la mitosis. Este modo de regulación previene la actividad de la nucleasa Mus81-Mms4 durante la fase S, al menos en su mayor parte, evitando así la potencial inestabilidad genómica que podría causar la escisión no controlada de determinados sustratos de DNA durante la replicación cromosómica. Por otra parte, la regulación de esta endonucleasa proporciona un mecanismo de salvaguardia para resolver, antes de la mitosis, diferentes intermediarios de DNA que no puedan ser procesados o escapen a la resolución por otras vías y permanezcan sin resolver al final de la fase S (Figura D3). Este mecanismo contribuye a asegurar la correcta compleción de la duplicación cromosómica y su posterior segregación, las cuales son esenciales para mantener la integridad del genoma, así como para la correcta progresión en el ciclo celular.

Los datos obtenidos en los ensayos de actividad nucleasa con el mutante defectivo en fosforilación *mms4-np* han indicado también que la fosforilación de Mms4 se requiere para el correcto funcionamiento de Mus81-Mms4. Este mutante ha proporcionado a su vez un sistema para analizar las consecuencias de la actividad defectiva de Mus81-Mms4 en células carentes de la helicasa RecQ Sgs1, dado que el mutante *sgs1Δmms4-np* es viable, mientras que los mutantes *mus81Δ* y *mms4Δ* son sintéticamente letales en combinación con *sgs1Δ* (Mullen *et al*, 2001). Los ensayos nucleasa han mostrado que las células *mms4-np* exhiben una actividad endonucleasa reducida, pero esta actividad residual permite la supervivencia celular en un fondo genético *sgs1Δ*. Por otra parte, al contrario que las células *mms4Δ*, el mutante *mms4-np* no muestra una sensibilidad significativa al tratamiento con MMS, HU, 4NQO o cisplatino en células *SGS1⁺*. Este resultado sugiere que la actividad nucleasa reducida del mutante *mms4-np* es suficiente para la respuesta celular a estos agentes cuando Sgs1 está presente. Sin embargo, en los mutantes de delección *sgs1Δ* la sensibilidad a MMS, HU, 4NQO y cisplatino se encuentra incrementada cuando Mms4 no puede fosforilarse, indicando que, en ausencia de la helicasa RecQ, la baja actividad nucleasa proporcionada por Mms4-np no es suficiente para hacer frente a los problemas originados por estas drogas, lo cual desemboca en hipersensibilidad a las mismas. Estos datos indican que la falta de la actividad helicasa RecQ hace crucial la función de Mus81-Mms4, y muestran que la fosforilación de Mms4 se requiere para conferir una completa actividad al complejo Mus81-Mms4 *in vivo*. Estos resultados también sugieren que la vía no-nucleolítica de resolución de intermediarios, mediada por el complejo Sgs1/Top3/Rmi1, sería la primera opción para resolver los intermediarios originados durante la reparación del DNA asociada a la replicación o a la parada de las horquillas de replicación (Figura D3). Mus81-Mms4, cuyo modo de

regulación restringe su periodo de acción, operaría más tarde escindiendo las estructuras de DNA no resueltas previamente por la vía no-nucleolítica.

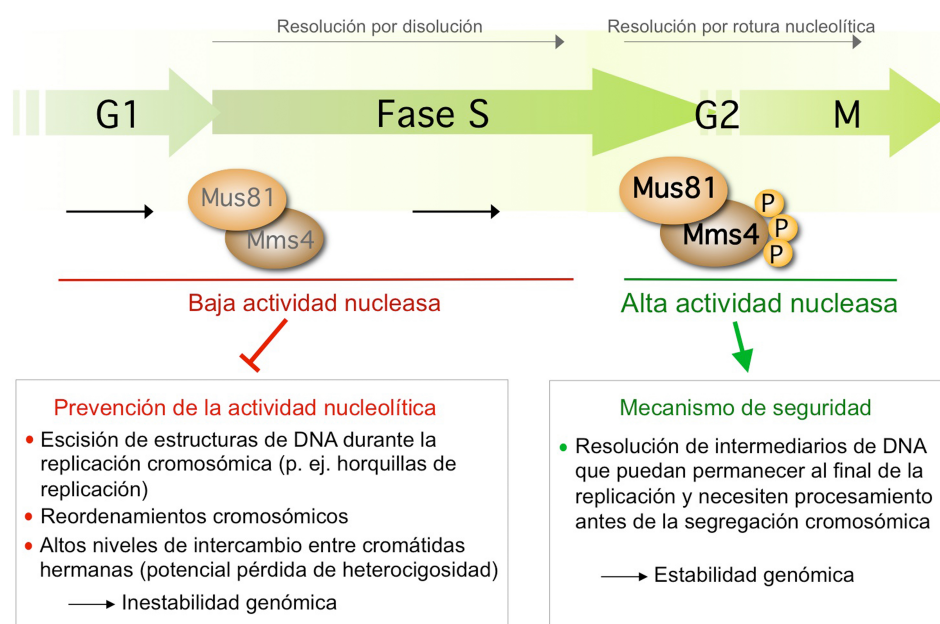


Figura D3. Regulación de la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 en el ciclo celular mitótico. La fosforilación de la subunidad Mms4 confiere alta actividad al complejo Mus81-Mms4 en G2/M. Este modo de regulación evita la acción nucleolítica de Mus81-Mms4 durante la replicación cromosómica y las posibles consecuencias negativas para la estabilidad del genoma derivadas de la misma, además de favorecer indirectamente la resolución de intermediarios por disolución (mediada por Sgs1/Top3/Rmi1) durante la fase S. Al mismo tiempo, la activación de la endonucleasa después de que la mayor parte de la replicación del genoma se haya completado constituye un mecanismo de seguridad para resolver intermediarios de DNA que no hayan sido resueltos por otras vías y necesiten procesamiento nucleolítico antes de la segregación cromosómica. Esta actuación facilita la finalización de la replicación del genoma y de los procesos de reparación del DNA, y contribuye por tanto a la estabilidad del genoma.

3. ¿Cómo se produce la activación de la endonucleasa Mus81-Mms4?

Una cuestión que todavía no está resuelta desde un punto de vista mecanístico es cómo puede inducirse la activación de Mus81-Mms4 mediante la fosforilación de Mms4 y cómo adquiere el complejo alta actividad endonucleasa cuando esta subunidad se modifica. Dado que la actividad nucleasa de Mus81-Mms4 requiere la unión de las dos subunidades (Kaliraman *et al*, 2001), consideramos razonable estudiar la posibilidad de que la fosforilación de Mms4 pudiera ser necesaria para el ensamblaje del complejo. Sin embargo, los experimentos de co-inmunoprecipitación de ambas subunidades que realizamos indicaron que el complejo Mus81-Mms4 se ensambla con independencia de la fase del ciclo celular y de la modificación de Mms4, por lo que descartamos esta hipótesis. Asimismo, nuestros estudios sobre la fosforilación de Mms4 en un fondo *mus81Δ* indicaron que esta modificación no requiere la formación previa del complejo Mus81-Mms4, puesto que se da en ausencia

de la subunidad catalítica, lo cual sugiere que la fosforilación de Mms4 y la formación del complejo endonucleasa del que forma parte son dos procesos independientes.

Otra hipótesis para explicar el requerimiento de la modificación de Mms4 para la activación de Mus81-Mms4 sería que la fosforilación posibilitara una multimerización del complejo que le confiriera una mayor actividad, ya que esta endonucleasa puede existir como dímero o como tetrámero (Gaskell *et al*, 2007). Sin embargo, distintos experimentos *in vitro* con Mus81-Mms4 purificada han descartado esta posibilidad (Schwartz *et al*, 2012).

Como alternativa a las anteriores hipótesis, pensamos que es posible que el papel de la fosforilación en la activación del complejo Mus81-Mms4 esté relacionado con cambios conformacionales del mismo que favorezcan la unión al sustrato o el intercambio enzima-sustrato. En este sentido, sería interesante el estudio de las propiedades bioquímicas de dos mutantes fosfomiméticos de Mms4 que constituyen versiones constitutivamente activas de la endonucleasa (Szakal y Branzei, 2013), ya que puede contribuir a la comprensión del mecanismo mediante el cual se produce la activación de Mus81-Mms4.

Por último, también sería posible que la fosforilación de Mms4 promoviera las interacciones de Mus81-Mms4 con otras proteínas y que estas facilitasen su actividad. Si bien se desconoce la relevancia de la modificación de Mms4 para ello, la unión de Mus81 con Rad27/FEN1 promueve la estimulación enzimática de ambas (Thu *et al*, 2015). Asimismo, Slx1-Slx4 puede estimular la actividad de Mus81-Mms4 (Thu *et al*, 2015), y la fosforilación de Mms4 permite la asociación de Mus81-Mms4 con Dpb11 en G2/M, que también interacciona con Slx4 (Gritenaite *et al*, 2014). Este complejo Mus81-Mms4-Dpb11-Slx4 podría facilitar la unión de la endonucleasa a sus sustratos, haciéndola más eficiente *in vivo* (Gritenaite *et al*, 2014).

4. Regulación de la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4 en condiciones de daño en el DNA

Tras establecer que la fosforilación de Mms4 mediada por CDK y PLK permite la adquisición de alta actividad endonucleasa al complejo Mus81-Mms4 en G2/M, una de las preguntas que nos planteamos fue si este modo de regulación podría ser diferente bajo condiciones en las que hubiese daño en el DNA. La existencia de lesiones en el material genético durante la fase S hace necesaria la actuación de diversas rutas de reparación y de tolerancia al daño en el DNA para que la replicación pueda completarse (Vazquez *et al*, 2008), las cuales generan potenciales sustratos para Mus81-Mms4. Por otra parte, los resultados de nuestro laboratorio habían mostrado

que Mus81-Mms4 es necesaria para que la replicación cromosómica pueda finalizar cuando el DNA está dañado (Vázquez, 2012). Por todo ello, cabía preguntarse si la presencia de lesiones en el DNA podría de alguna forma inducir o modificar el mecanismo regulador de la endonucleasa que encontramos en un ciclo celular normal, en el que no existe daño en el DNA originado exógenamente.

Nuestros datos indican que las lesiones en el DNA producidas durante la fase S no modifican el modo en que Mus81-Mms4 se activa en un ciclo celular normal. Los resultados obtenidos han mostrado que la fosforilación de Mms4 y la adquisición de alta actividad endonucleasa por Mus81-Mms4 en células tratadas con MMS durante la fase S permanece restringida hasta que las células finalizan la replicación de la mayor parte del DNA. Por tanto, la regulación de Mus81-Mms4 en presencia de lesiones en el DNA que interfieren con la replicación se produce de la misma manera que en un ciclo celular sin perturbaciones (Figuras D1 y D3). Además, la ausencia de la helicasa RecQ Sgs1 o de la resolvasa Yen1, proteínas con las que Mus81-Mms4 interacciona funcionalmente (Ashton *et al*, 2011; Blanco *et al*, 2010; Hickson y Mankouri, 2011; Ho *et al*, 2010; Kaliraman *et al*, 2001; Tay y Wu, 2010), no tiene un efecto aparente sobre la regulación de Mus81-Mms4. Así, la activación de Mus81-Mms4 a través de la fosforilación de Mms4 es independiente de la presencia de daño en el DNA durante la replicación cromosómica, incluso cuando el número de lesiones acumuladas puede incrementarse debido a la situación patológica originada por la ausencia de proteínas con las que esta endonucleasa presenta funciones solapantes. Todo ello indica que la función de Mus81-Mms4 únicamente se ejerce, independientemente de la presencia o ausencia de daño en el material genético, una vez que se ha completado la replicación de la mayor parte del genoma. De acuerdo con estos resultados, los datos de nuestro laboratorio han indicado que las consecuencias de la ausencia de Mus81-Mms4 durante la replicación de un DNA dañado son en gran parte reversibles mediante la nueva expresión del complejo al final de la fase S (Vázquez, 2012).

5. Desregulación de la actividad endonucleasa de Mus81-Mms4

Si bien la fosforilación de Mms4 y la subsiguiente activación del complejo Mus81-Mms4 únicamente se producen cuando las células han replicado la mayor parte del genoma, aun en presencia de daño en el DNA, existen sin embargo situaciones patológicas en las que la actividad de la endonucleasa puede estar desregulada y puede afectar a la estabilidad genómica. Así, hemos mostrado que Mus81-Mms4 se activa prematuramente en ausencia de un *checkpoint* de la fase S funcional debido a la falta de la proteína Rad53, dado que en estas condiciones la

replicación cromosómica no se ha completado (Tercero y Diffley, 2001). Esta activación prematura podría tener consecuencias negativas para las células, derivadas de una función nucleolítica no deseada durante la replicación. De acuerdo con nuestros datos, Szakal y Branzei (2013) han mostrado también una activación prematura de Mus81-Mms4 en células carentes de las proteínas del *checkpoint* Mec1/Ddc2. Esto tiene como resultado un aumento de los sobrecruzamientos y una disminución dependiente de Mms4 del número de intermediarios de recombinación acumulados en mutantes *sgs1Δ* (Szakal y Branzei, 2013). Por lo tanto, probablemente de forma indirecta, el *checkpoint* de la fase S, cuya función es esencial para la respuesta celular al daño en el DNA y al estrés replicativo (Segurado y Tercero, 2009; Yazinski y Zou, 2016), tiene un papel en la prevención de la activación de Mus81-Mms4 hasta G2/M. No obstante, si bien la activación prematura de Mus81-Mms4 añade sin duda problemas en las células que carecen de un *checkpoint* funcional, resultados de nuestro laboratorio han indicado que la delección de *MUS81* en un mutante *rad53Δ* no suprime la sensibilidad del mismo a agentes que causan lesiones en el DNA o estrés replicativo. De lo anterior se deduce que, como podía esperarse, la prevención de la actividad nucleolítica de Mus81-Mms4 durante la replicación no es una de las funciones principales del *checkpoint* de la fase S.

En otra parte de la tesis también hemos mostrado que, si la expresión de la quinasas del tipo Polo Cdc5 se desregula, como podría ocurrir en determinadas situaciones patológicas en las que su homóloga humana Plk1 se sobreexpresa (Strebhardt y Ullrich, 2006), Mus81-Mms4 se activa de forma prematura, durante la fase S, lo que podría ser perjudicial para la replicación cromosómica. De hecho, Matos *et al* (2013) han mostrado que la expresión ectópica de Cdc5 causa un aumento en la frecuencia de sobrecruzamientos mitóticos, y que estos dependen de Mus81.

En otro trabajo también se han analizado las consecuencias que podría tener para la estabilidad del genoma una fosforilación constitutiva de Mms4, y consecuentemente una alta actividad permanente de Mus81-Mms4. Así, utilizando dos mutantes fosfomiméticos de Mms4, Szakal y Branzei (2013) han mostrado que la actividad desregulada y prematura de Mus81-Mms4 ocasiona un incremento en la frecuencia de sobrecruzamientos asociados a translocaciones. Además, la activación constitutiva de esta endonucleasa interfiere negativamente con el *baipás* del daño en el DNA mediante un mecanismo libre de errores, ya que provoca una disminución en las estructuras en forma de X que representan uniones entre cromátidas hermanas, lo que indica una resolución prematura de las mismas (Szakal y Branzei, 2013).

Es evidente que el correcto funcionamiento de Mus81-Mms4/EME1, y por tanto una regulación estricta de esta endonucleasa, es fundamental para prevenir la

inestabilidad genómica, una característica común de las células cancerosas (Negrini *et al*, 2010). Aunque no está claro si Mus81 es importante para la prevención de la tumorigénesis (McPherson *et al*, 2004; Dendouga *et al*, 2005), los defectos asociados a la expresión de Mus81 pueden estar relacionados con varios tipos de cáncer (Wu *et al*, 2010; Xie *et al*, 2016). Además, esta endonucleasa está implicada en la genotoxicidad inducida por oncogenes (Neelsen *et al*, 2013; Murfuni *et al*, 2013). Por todo ello, sería interesante estudiar en más profundidad si esta endonucleasa se encuentra desregulada en determinadas células tumorales. Serán necesarios futuros trabajos para explorar el posible potencial de MUS81-EME1 como marcador tumoral, así como para obtener información que pueda contribuir a la mejora de las terapias contra el cáncer.

6. Regulación de la actividad de Mus81-Mms4/EME1 en diferentes organismos

Durante el transcurso de esta tesis otros grupos han presentado resultados, similares en parte a los nuestros, que, en primer lugar, validan nuestros datos y, a su vez, muestran que los aspectos básicos de la regulación de Mus81-Mms4/EME1 están conservados evolutivamente. Esta conservación incide en la importancia que tiene el control de esta endonucleasa en todos los eucariotas. Así, Matos *et al* (2011) y Szakal y Branzei (2013) han mostrado de forma paralela a nuestro trabajo que la regulación de la actividad de Mus81-Mms4 en *S. cerevisiae* se produce mediante la fosforilación de Mms4. Además, Matos *et al* (2011) encontraron que esta modificación y la regulación derivada de la misma se producen de forma similar en la endonucleasa MUS81-EME1 de células humanas y que ocurre también en meiosis. La actividad de Mus81-Eme1 de *S. pombe* también está regulada por fosforilación de la subunidad no catalítica Eme1 (Dehe *et al*, 2013). En todos los sistemas, este modo de regulación de la endonucleasa tiene como consecuencia una baja actividad de la misma durante las fases G1 y S del ciclo celular y la adquisición de una alta actividad alrededor de G2/M.

A pesar de la conservación evolutiva del modo de regulación de Mus81-Mms4/EME1 que hemos descrito, existen algunas diferencias entre los diferentes organismos estudiados. Mientras que en *S. cerevisiae* y en células humanas la fosforilación de Mms4/EME1 depende de CDK y Cdc5/PLK1 (esta tesis; Matos *et al*, 2011; Szakal y Branzei, 2013), la modificación de Eme1/Mms4 en *S. pombe* depende de Cdc2 (CDK1) pero no de Plo1 (PLK1) (Dehe *et al*, 2013). Además, en esta levadura de fisión, y a diferencia de lo que hemos encontrado en nuestro trabajo, la fosforilación de Eme1/Mms4 se incrementa en G2 por el tratamiento con drogas que causan daño en el DNA, o por la ausencia de Rqh1 (Sgs1/BLM). Esta hiperfosforilación depende de

Rad3 (ATR/Mec1) y Chk1 y tiene como consecuencia un aumento de la actividad de Mus81-Eme1 (Dehe *et al*, 2013). Recientemente se ha encontrado en *S. cerevisiae* que, además de Cdc28/CDK1 y Cdc5/PLK1, la quinasa Cdc7 también participa en la fosforilación de Mms4, facilitando el acceso de Cdc28 y Cdc5 a Mus81-Mms4 a través de Rtt107 y resultando necesaria para la activación del complejo (Princz *et al*, 2017). Este nuevo resultado añade un grado más de complejidad a la regulación de Mus81-Mms4/EME1, pero se desconoce si, además de en *S. cerevisiae*, Cdc7 participa en la fosforilación de la subunidad no catalítica en otros organismos.

En *S. pombe*, además de Eme1/Mms4, la subunidad catalítica Mus81 también está regulada por fosforilación después de un tratamiento con hidroxiaurea, en este caso mediada por Cds1 (Rad53, CHK2) (Boddy *et al*, 2000). Esta modificación permitiría la disociación de Mus81 de la cromatina, evitando así la posible actuación de la endonucleasa después de la parada de las horquillas tras la exposición a HU (Kai *et al*, 2005). En células humanas, MUS81 también estaría regulada negativamente por fosforilación dependiente de Wee1, bien sea de forma directa o indirecta (Domínguez-Kelly *et al*, 2011; Duda *et al*, 2016). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si en *S. cerevisiae* existe un mecanismo similar de modificación de la subunidad catalítica que pueda contribuir a la regulación de la endonucleasa Mus81-Mms4.

En células humanas y en *Drosophila*, MUS81-EME1 se asocia con otras proteínas formando un macro-complejo con otras dos endonucleasas específicas de estructura: SLX4-SLX1 y XPF-ERCC1 (*S. cerevisiae* Rad1-Rad10), donde SLX4 actúa como plataforma de anclaje para el resto de proteínas (Andersen *et al*, 2009; Fekairi *et al*, 2009; Munoz *et al*, 2009; Saito *et al*, 2009; Svendsen *et al*, 2009). En el caso de células humanas, y en contraste con la situación en *S. cerevisiae*, la fosforilación de EME1/Mms4 no activa directamente la endonucleasa MUS81-EME1, sino que promueve su interacción con SLX1-SLX4 (Wyatt *et al*, 2013). La coordinación de los sitios activos de ambas endonucleasas permite la resolución *in vivo* de uniones de Holliday (Castor *et al*, 2013; Garner *et al*, 2013; Wyatt *et al*, 2013). Además, el macro-complejo formado por las tres endonucleasas, denominado “tri-nucleasa SMX de reparación de DNA”, es mucho más activo que cada una de las endonucleasas individualmente, pudiendo escindir eficientemente distintos intermediarios de recombinación y horquillas de replicación gracias a las interacciones entre sus componentes (Wyatt *et al*, 2017). En *S. cerevisiae* no se ha encontrado este macro-complejo, si bien, como se ha mencionado previamente, la modificación de Mms4 promueve la asociación de Mus81-Mms4 con Slx4 a través de Dpb11, lo que podría incrementar la eficiencia de la endonucleasa *in vivo* (Gritenaite *et al*, 2014).

Por último, cabe destacar que, en células humanas, y a diferencia de levaduras, MUS81 puede formar un heterodímero con dos subunidades no catalíticas distintas: EME1 (homóloga a Mms4) y EME2. Aunque tanto MUS81-EME1 como MUS81-EME2 pueden procesar *in vitro* estructuras de DNA ramificadas, MUS81-EME2 tiene mayor actividad nucleasa y una especificidad de sustrato más amplia (Amangyeld *et al*, 2014; Pepe y West, 2014). La actuación de este segundo complejo, a diferencia de MUS81-EME1 y Mus81-Mms4, se restringe a la fase S, y estaría implicado en el procesamiento de horquillas bloqueadas para promover la reanudación de la replicación, así como en el mantenimiento de los telómeros en células ALT, que carecen de actividad telomerasa (Pepe y West, 2014). La existencia de este segundo complejo muestra una extraordinaria complejidad en la regulación de la endonucleasa MUS81 en células humanas, que sin duda necesita un mayor estudio que permita establecer con mayor claridad las diferencias funcionales entre MUS81-EME1 y MUS81-EME2 y, especialmente, el modo de control de este último.

7. Consideraciones finales

El trabajo realizado en los últimos años por varios grupos ha puesto de manifiesto la importancia del estudio del control de la actividad de la endonucleasa Mus81-Mms4/EME1 cuando las células proliferan. Como se ha mencionado anteriormente, este control es fundamental para el mantenimiento de la estabilidad genómica, y va dirigido tanto a garantizar su función nucleolítica cuando es necesaria como a evitar su acción cuando puede poner en riesgo la integridad del genoma. Los resultados obtenidos en esta tesis nos han permitido contribuir a la comprensión de la regulación de la actividad de Mus81-Mms4/EME1 y proponer un modelo que explica cómo ocurre esta en un ciclo celular mitótico. Los datos que presentamos indican que la función de la endonucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* en la resolución de intermediarios de DNA solo se lleva a cabo una vez que la mayor parte de la replicación del genoma se ha completado. Esta función "post-replicativa" tiene ventajas para la célula, ya que ayuda a mantener la estabilidad del genoma. Así, la prevención de su actividad nucleolítica durante la fase S evita la contraproducente escisión de estructuras de DNA durante la replicación cromosómica, como las horquillas de replicación. Además, la baja actividad de Mus81-Mms4 durante la fase S, incluso cuando el DNA está dañado, evita el corte de intermediarios durante la reparación del DNA que podría producir reordenamientos cromosómicos indeseados y elevados niveles de intercambio entre cromátidas hermanas, con el consiguiente riesgo de pérdida de heterocigosidad (Figura D3). Indirectamente, la baja actividad de

Mus81-Mms4 durante la fase S favorece la acción de la ruta de resolución no-nucleolítica mediada por Sgs1-Top3-Rmi1 (BLM-TOPIIIa-RMI1-RMI2 en células humanas), la cual no origina sobrecruzamientos ni potenciales reordenamientos cromosómicos. Asimismo, la activación de Mus81-Mms4 en su debido momento del ciclo celular proporciona un mecanismo de seguridad o salvaguarda que garantiza, justo antes de la segregación cromosómica, la resolución de intermediarios de DNA que no han sido resueltos y necesitan ser procesados para que la reparación del DNA y la replicación cromosómica se completen con éxito (Figura D3). Esta acción nucleolítica puede poner todavía a las células en algún riesgo de inestabilidad genómica, pero constituye el necesario último recurso para la resolución de determinados intermediarios de DNA que persisten después de la replicación.

CONCLUSIONES

1. Mms4, la subunidad no catalítica del complejo endonucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae*, se fosforila durante el ciclo celular en el periodo comprendido entre el final de la fase S y la segregación cromosómica.
2. La fosforilación de Mms4 depende de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) Cdc28.
3. La función de Cdc28 en la fosforilación de Mms4 no depende de ciclinas específicas, pudiendo asociarse para ello tanto con ciclinas de fase S como con ciclinas mitóticas.
4. La fosforilación de Mms4 depende también de la quinasa del tipo Polo (PLK) Cdc5.
5. La fosforilación de Mms4 se requiere para la actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4.
6. El modo de regulación de Mus81-Mms4 limita su actividad nucleasa a lo largo del ciclo celular, siendo esta alta en la transición G2/M y durante la mitosis, y baja durante las fases G1 y S.
7. La activación de Mus81-Mms4 solo ocurre cuando las células finalizan la fase S, aun en presencia de lesiones de DNA que interfieren con la replicación cromosómica o en ausencia de otras vías de disolución/resolución de intermediarios de DNA.
8. El modo de regulación de Mus81-Mms4 impide una alta actividad de esta endonucleasa durante la fase S, evitando así la rotura de algunas estructuras de DNA durante la replicación cromosómica que podría causar inestabilidad genómica. Al mismo tiempo, proporciona un mecanismo de seguridad para el procesamiento de intermediarios de DNA que persisten al final de la fase S y necesitan ser procesados antes de la segregación cromosómica, lo que garantiza la finalización de la replicación del genoma y de los procesos de reparación del DNA.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham J, Lemmers B, Hande MP, Moynahan ME, Chahwan C, Ciccio A, Essers J, Hanada K, Chahwan R, Khaw AK, McPherson P, Shehabeldin A, Laister R, Arrowsmith C, Kanaar R, West SC, Jasin M, Hakem R (2003) Eme1 is involved in DNA damage processing and maintenance of genomic stability in mammalian cells. *EMBO J* **22**: 6137-6147
- Agmon N, Yovel M, Harari Y, Liefshitz B, Kupiec M (2011) The role of Holliday junction resolvases in the repair of spontaneous and induced DNA damage. *Nucleic Acids Res* **39**: 7009-7019
- Agostinho A, Meier B, Sonnevile R, Jagut M, Woglar A, Blow J, Jantsch V, Gartner A (2013) Combinatorial regulation of meiotic holliday junction resolution in *C. elegans* by HIM-6 (BLM) helicase, SLX-4, and the SLX-1, MUS-81 and XPF-1 nucleases. *PLoS Genet* **9**: e1003591
- Aguilera A, Garcia-Muse T (2013) Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* **47**: 1-32
- Amangyeld T, Shin YK, Lee M, Kwon B, Seo YS (2014) Human MUS81-EME2 can cleave a variety of DNA structures including intact Holliday junction and nicked duplex. *Nucleic Acids Res* **42**: 5846-5862
- Amon A, Tyers M, Futcher B, Nasmyth K (1993) Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* **74**: 993-1007
- Anand RP, Lovett ST, Haber JE (2013) Break-induced DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a010397
- Andersen SL, Bergstralh DT, Kohl KP, LaRocque JR, Moore CB, Sekelsky J (2009) MUS312 and the Vertebrate Ortholog BTBD12 Interact with DNA Structure-Specific Endonucleases in DNA Repair and Recombination. *Mol Cell* **35**: 128-135
- Andersen SL, Kuo HK, Savukoski D, Brodsky MH, Sekelsky J (2011) Three Structure-Selective Endonucleases Are Essential in the Absence of BLM Helicase in *Drosophila*. *PLoS Genet* **7**: e1002315
- Ashton TM, Mankouri HW, Heidenblut A, McHugh PJ, Hickson ID (2011) Pathways for Holliday junction processing during homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **31**: 1921-1933
- Barnes DE, Lindahl T (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* **38**: 445-476
- Bastin-Shanower SA, Fricke WM, Mullen JR, Brill SJ (2003) The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10. *Mol Cell Biol* **23**: 3487-3496
- Bell SP, Labib K (2016) Chromosome Duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **203**: 1027-1067
- Bjelland S, Seeberg E (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* **531**: 37-80
- Blanco MG, Matos J, Rass U, Ip SC, West SC (2010) Functional overlap between the structure-specific nucleases Yen1 and Mus81-Mms4 for DNA-damage repair in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **9**: 394-402
- Blanco MG, Matos J, West SC (2014) Dual control of Yen1 nuclease activity and cellular localization by Cdk and Cdc14 prevents genome instability. *Mol Cell* **54**: 94-106
- Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR, 3rd, Russell P (2001) Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* **107**: 537-548

- Boddy MN, Lopez-Girona A, Shanahan P, Interthal H, Heyer WD, Russell P (2000) Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Mol Cell Biol* **20**: 8758-8766
- Boiteux S, Jinks-Robertson S (2013) DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**: 1025-1064
- Bousset K, Diffley JFX (1998) The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase. *Genes Dev* **12**: 480-490
- Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Rev Mol Cell Biol* **9**: 297-308
- Branzei D, Foiani M (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 208-219
- Branzei D, Psakhye I. (2016) DNA damage tolerance. *Curr Opin Cell Biol* **40**: 137-144
- Branzei D, Szakal B (2016) DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair (Amst)* **44**: 68-75
- Castor D, Nair N, Declais AC, Lachaud C, Toth R, Macartney TJ, Lilley DM, Arthur JS, Rouse J (2013) Cooperative control of holliday junction resolution and DNA repair by the SLX1 and MUS81-EME1 nucleases. *Mol Cell* **52**: 221-233
- Chan YW, West SC (2014) Spatial control of the GEN1 Holliday junction resolvase ensures genome stability. *Nat Commun* **5**: 1-11
- Chang DJ, Cimprich KA (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol* **5**: 82-90
- Chang JH, Kim JJ, Choi JM, Lee JH, Cho Y (2008) Crystal structure of the Mus81-Eme1 complex. *Genes Dev* **22**: 1093-1106
- Chang M, Bellaoui M, Zhang C, Desai R, Morozov P, Delgado-Cruzata L, Rothstein R, Freyer GA, Boone C, Brown GW (2005) RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *EMBO J* **24**: 2024-2033
- Chen J, Derfler B, Samson L (1990) *Saccharomyces cerevisiae* 3-methyladenine DNA glycosylase has homology to the AlkA glycosylase of *E. coli* and is induced in response to DNA alkylation damage. *EMBO J* **9**: 4569-4575.
- Chen XB, Melchionna R, Denis CM, Gaillard PH, Blasina A, Van de Weyer I, Boddy MN, Russell P, Vialard J, McGowan CH (2001) Human MUS81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions *in vitro*. *Mol Cell* **8**: 1117-1127
- Cheng L, Hunke L, Hardy CFJ (1998) Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Polo-like kinase Cdc5p. *Mol Cell Biol* **18**: 7360-7370
- Ciccio A, Constantinou A, West SC (2003) Identification and characterization of the human Mus81-Eme1 endonuclease. *J Biol Chem* **278**: 25172-25178
- Ciccio A, McDonald N, West SC (2008) Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem* **77**: 259-287
- Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* **85**: 1083-1099

- Coulon S, Gaillard PH, Chahwan C, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Russell P (2004) Slx1-Slx4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains ribosomal DNA in fission yeast. *Mol Biol Cell* **15**: 71-80
- Daley JM, Palmboos PL, Wu D, Wilson TE (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 431-451
- Davies AA, Huttner D, Daigaku Y, Chen S, Ulrich HD (2008) Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein A. *Mol Cell* **29**: 625-636
- de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**: 768-785
- De Muyt A, Jessop L, Kolar E, Sourirajan A, Chen J, Dayani Y, Lichten M (2012) BLM helicase ortholog Sgs1 is a central regulator of meiotic recombination intermediate metabolism. *Mol Cell* **46**: 43-53
- Dehe PM, Coulon S, Scaglione S, Shanahan P, Takedachi A, Wohlschlegel JA, Yates JR 3rd, Llorente B, Russell P, Gaillard PH (2013) Regulation of Mus81-Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 598-603
- Dehe PM, Gaillard PH (2017) Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**: 315-330
- Dendouga N, Gao H, Moechars D, Janicot M, Vialard J, McGowan CH (2005) Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **25**: 7569-7579
- Doe CL, Ahn JS, Dixon J, Whitby MC (2002) Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem* **277**: 32753-32759
- Dohmen RJ, Wu P, Varshavsky A (1994) Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science* **263**: 1273-1276
- Domínguez-Kelly R, Martín Y, Koundrioukoff S, Tanenbaum ME, Smits VAJ, Medema RH, Debatisse M, Freire R (2011) Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol* **194**: 567-579
- Duda H, Arter M, Gloggnitzer J, Teloni F, Wild P, Blanco MG, Altmeyer M, Matos J (2016) A Mechanism for Controlled Breakage of Under-replicated Chromosomes during Mitosis. *Dev Cell* **39**: 740-755
- Dunin-Horkawicz S, Feder M, Bujnicki JM (2006) Phylogenomic analysis of the GIY-YIG nuclease superfamily. *BMC Genomics* **7**: 98
- Ehmsen KT, Heyer WD (2008) *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 is a catalytic, DNA structure-selective endonuclease. *Nucleic Acids Res* **36**: 2182-2195
- Elia AE, Cantley LC, Yaffe MB (2003a) Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* **299**: 1228-1231
- Elia AE, Rellos P, Haire LF, Chao JW, Ivins FJ, Hoepker K, Mohammad D, Cantley LC, Smerdon SJ, Yaffe MB (2003b) The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115**: 83-95
- Fabre F, Chan A, Heyer WD, Gangloff S (2002) Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16887-16892

- Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, Dong MQ, Ruse C, Yates JR, 3rd, Russell P, Fuchs RP, McGowan CH, Gaillard PH (2009) Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell* **138**: 78-89
- Ferguson LR, Baguley BC (1996) Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutat Res* **355**: 91-101
- Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G, Plevani P (1994) The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol Cell Biol* **14**: 923-933
- Fricke WM, Bastin-Shanower SA, Brill SJ (2005) Substrate specificity of the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease. *DNA Repair (Amst)* **4**: 243-251
- Fricke WM, Brill SJ (2003) Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1-Top3. *Genes Dev* **17**: 1768-1778
- Fu Y, Xiao W (2003) Functional domains required for the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease complex formation and nuclear localization. *DNA Repair (Amst)* **2**: 1435-1447
- Gaillard PH, Noguchi E, Shanahan P, Russell P (2003) The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Mol Cell* **12**: 747-759
- Gao M, Rendtlew Danielsen J, Wei LZ, Zhou DP, Xu Q, Li MM, Wang ZQ, Tong WM, Yang YG (2012) A novel role of human holliday junction resolvase GEN1 in the maintenance of centrosome integrity. *PLoS One* **7**: e49687
- Garner E, Kim Y, Lach FP, Kottemann MC, Smogorzewska A (2013) Human GEN1 and the SLX4-associated nucleases MUS81 and SLX1 are essential for the resolution of replication-induced Holliday junctions. *Cell Rep* **5**: 207-215
- Gaskell LJ, Osman F, Gilbert RJ, Whitby MC (2007) Mus81 cleavage of Holliday junctions: a failsafe for processing meiotic recombination intermediates? *EMBO J* **26**: 1891-901
- Giannattasio M, Branzei D (2017) S-phase checkpoint regulations that preserve replication and chromosome integrity upon dNTP depletion. *Cell Mol Life Sci* **74**: 2362-2380
- Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425
- Gritenaite D, Princz LN, Szakal B, Bantele SC, Wendeler L, Schilbach S, Habermann BH, Matos J, Lisby M, Branzei D, Pfander B (2014) A cell cycle-regulated Slx4-Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication. *Genes Dev* **28**: 1604-1619
- Guengerich FP (2000) Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **21**: 345-351
- Guillet M, Boiteux S (2002) Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **21**: 2833-2841
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hartung F, Suer S, Bergmann T, Puchta H (2006) The role of AtMUS81 in DNA repair and its genetic interaction with the helicase AtRECQ4A. *Nucleic Acids Res* **34**: 4438-4448

- Hartwell LH (1967) Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J Bacteriol* **93**: 1662-1670
- Hefferin ML, Tomkinson AE (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**: 639-648
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**: 113-139
- Hickson ID, Mankouri HW (2011) Processing of homologous recombination repair intermediates by the Sgs1-Top3-Rmi1 and Mus81-Mms4 complexes. *Cell Cycle* **10**: 3078-3085
- Hiyama T, Katsura M, Yoshihara T, Ishida M, Kinomura A, Tonda T, Asahara T, Miyagawa K (2006) Haploinsufficiency of the Mus81-Eme1 endonuclease activates the intra-S-phase and G2/M checkpoints and promotes rereplication in human cells. *Nucleic Acids Res* **34**: 880-892
- Ho CK, Mazon G, Lam AF, Symington LS (2010) Mus81 and Yen1 promote reciprocal exchange during mitotic recombination to maintain genome integrity in budding yeast. *Mol Cell* **40**: 988-1000
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135-141
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374
- Husain I, Griffith J, Sancar A (1988) Thymine dimers bend DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 2558-2562
- Interthal H, Heyer HD (2000) *MUS81* encodes a novel Helix-hairpin-Helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **263**: 812-827
- Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC (2008) Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**: 357-361
- Ira G, Malkova A, Liberi G, Foiani M, Haber JE (2003) Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115**: 401-411
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**: 1011-1017
- Jaspers NG, Raams A, Silengo MC, Wijgers N, Niedernhofer LJ, Robinson AR, Giglia-Mari G, Hoogstraten D, Kleijer WJ, Hoeijmakers JH, Vermeulen W (2007) First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am J Hum Genet* **80**: 457-466
- Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 335-346
- Kai M, Boddy MN, Russell P, Wang TS (2005) Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev* **19**: 919-932
- Kaliraman V, Mullen JR, Fricke WM, Bastin-Shanower SA, Brill SJ (2001) Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev* **15**: 2730-2740
- Kass EM, Jasin M (2010) Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* **584**: 3703-3708
- Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A (2011) Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet* **43**: 142-146

- Kolodner RD, Putnam CD, Myung K (2002) Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**: 552-557
- Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**: 233-71
- Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**: 681-710
- Labib K, Diffley JFX, Kearsey SE (1999) G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* **1**: 415-422
- Labib K, Tercero JA, Diffley JF (2000) Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* **288**: 1643-1647
- Lee SE, Frenz LM, Wells NJ, Johnson AL, Johnston LH (2001) Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5. *Curr Biol* **11**: 784-788
- Li X, Heyer WD (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**: 99-113
- Lieber MR (1997) The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *Bioessays* **19**: 233-240
- Lieber MR (2010) NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 393-395
- Lindahl T (2001) Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**: xvii-xxx
- Lisby M, Rothstein R, Mortensen UH (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8276-8282
- Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, Liberi G, Plevani P, Muzi-Falconi M, Newlon C, Foiani M (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**: 557-561
- Lorenz A, West SC, Whitby MC (2010) The human Holliday junction resolvase GEN1 rescues the meiotic phenotype of a *Schizosaccharomyces pombe* mus81 mutant. *Nucleic Acids Res* **38**: 1866-1873
- Ma W, Resnick MA, Gordenin DA (2008) Apr1 and Apr2 endonucleases prevent accumulation of repair-associated DNA breaks in budding yeast as revealed by direct chromosomal analysis. *Nucleic Acids Res* **36**: 1836-1846
- Mankouri HW, Ashton TM, Hickson ID (2011) Holliday junction-containing DNA structures persist in cells lacking Sgs1 or Top3 following exposure to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4944-4949
- Matos J, Blanco MG, Maslen S, Skehel JM, West SC (2011) Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and Mitosis. *Cell* **147**: 158-172
- Matos J, Blanco MG, West SC (2013) Cell-cycle kinases coordinate the resolution of recombination intermediates with chromosome segregation. *Cell Rep* **4**: 76-86
- McPherson JP, Lemmers B, Chahwan R, Pamidi A, Migon E, Matysiak-Zablocki E, Moynahan ME, Essers J, Hanada K, Poonepalli A, Sanchez-Sweetman O, Khokha R, Kanaar R, Jasin M, Hande MP, Hakem R (2004) Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression. *Science* **304**: 1822-1826
- Mehta A, Haber J (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a016428

- Mendenhall MD, Hodge AE (1998) Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1191-1243
- Mortensen EM, Haas W, Gygi M, Gygi SP, Kellogg DR (2005) Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/Polo kinase. *Curr Biol*: **15**: 2033-2037
- Mortensen UH, Bendixen C, Sunjevaric I, Rothstein R (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10729-10734
- Mullen JR, Kaliraman V, Ibrahim SS, Brill SJ (2001) Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 103-118
- Mullen JR, Nallaseth FS, Lan YQ, Slagle CE, Brill SJ (2005) Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1-Top3 complex. *Mol Cell Biol* **25**: 4476-4487
- Munoz IM, Hain K, Declais AC, Gardiner M, Toh GW, Sanchez-Pulido L, Heuckmann JM, Toth R, Macartney T, Eppink B, Kanaar R, Ponting CP, Lilley DM, Rouse J (2009) Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Mol Cell* **35**: 116-127
- Murfuni I, Nicolai S, Baldari S, Crescenzi M, Bignami M, Franchitto A, Pichierri P (2013) The WRN and MUS81 proteins limit cell death and genome instability following oncogene activation. *Oncogene* **32**: 610-620
- Neelsen KJ, Zanini IM, Herrador R, Lopes M (2013) Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *J Cell Biol* **200**: 699-708
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 220-228
- Newman M, Murray-Rust J, Lally J, Rudolf J, Fadden A, Knowles PP, White MF, McDonald NQ (2005) Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition. *EMBO J* **24**: 895-905
- Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A, Lalai AS, Robinson AR, Appeldoorn E, Odijk H, Oostendorp R, Ahmad A, van Leeuwen W, Theil AF, Vermeulen W, van der Horst GT, Meinecke P, Kleijer WJ, Vijg J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (2006) A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* **444**: 1038-1043
- Nishino K, Inoue E, Takada S, Abe T, Akita M, Yoshimura A, Tada S, Kobayashi M, Yamamoto K, Seki M, Enomoto T (2008) A novel role for Rad17 in homologous recombination. *Genes Genet Syst* **83**: 427-431
- Nishino T, Komori K, Ishino Y, Morikawa K (2003) X-Ray and Biochemical Anatomy of an Archaeal XPF/Rad1/Mus81 Family Nuclease. *Structure* **11**: 445-457
- Nishino T, Komori K, Ishino Y, Morikawa K (2005) Structural and functional analyses of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 nuclease: asymmetric DNA binding and cleavage mechanisms. *Structure* **13**: 1183-1192
- O'Neil NJ, Martin JS, Youds JL, Ward JD, Petalcorin MIR, Rose AM, Boulton SJ (2013) Joint Molecule Resolution Requires the Redundant Activities of MUS-81 and XPF-1 during *Caenorhabditis elegans* Meiosis. *PLoS Genet* **9**: e1003582
- Osman F, Dixon J, Doe CL, Whitby MC (2003) Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell* **12**: 761-774

- Osman F, Whitby MC (2007) Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1004-1017
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349-404
- Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1039-1056
- Paulovich AG, Hartwell LH (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* **82**: 841-847
- Pepe A, West SC (2014) MUS81-EME2 promotes replication fork restart. *Cell Rep* **7**: 1048-1055
- Povirk LF (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res* **355**: 71-89
- Prasher JM, Lalai AS, Heijmans-Antonissen C, Ploemacher RE, Hoeijmakers JH, Touw IP, Niedernhofer LJ (2005) Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *EMBO J* **24**: 861-871
- Princz LN, Wild P, Bittmann J, Aguado FJ, Blanco MG, Matos J, Pfander B (2017) Dbf4-dependent kinase and the Rtt107 scaffold promote Mus81-Mms4 resolvase activation during mitosis. *EMBO J* **36**: 664-678
- Rass U (2013) Resolving branched DNA intermediates with structure-specific nucleases during replication in eukaryotes. *Chromosoma* **122**: 499-515
- Rass U, Compton SA, Matos J, Singleton MR, Ip SC, Blanco MG, Griffith JD, West SC (2010) Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes Dev* **24**: 1559-69
- Rass U, West SC (2006) Synthetic junctions as tools to identify and characterize Holliday junction resolvases. *Methods Enzymol* **408**: 485-501
- Reynolds RJ, Love JD, Friedberg EC (1981) Molecular mechanisms of pyrimidine dimer excision in *Saccharomyces cerevisiae*: excision of dimers in cell extracts. *J Bacteriol* **147**: 705-708
- Rose MD, Winston F, Hieter P (1989) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Roseaulin L, Yamada Y, Tsutsui Y, Russell P, Iwasaki H, Arcangioli B (2008) Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks. *EMBO J* **27**: 1378-1387
- Saito TT, Lui DY, Kim HM, Meyer K, Colaiacovo MP (2013) Interplay between structure-specific endonucleases for crossover control during *Caenorhabditis elegans* meiosis. *PLoS Genet* **9**: e1003586
- Saito TT, Youds JL, Boulton SJ, Colaiacovo MP (2009) *Caenorhabditis elegans* HIM-18/SLX-4 interacts with SLX-1 and XPF-1 and maintains genomic integrity in the germline by processing recombination intermediates. *PLoS Genet* **5**: e1000735
- Sale JE (2013) Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a012708
- Sancar A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **103**: 2203-2237

- Sarbajna S, West SC (2014) Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends Biochem Sci* **39**: 409-419.
- Saugar I, Ortiz-Bazan MA, Tercero JA (2014) Tolerating DNA damage during eukaryotic chromosome replication. *Exp Cell Res* **329**: 170-177
- Schiestl RH, Gietz RD (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339-346
- Schwartz EK, Heyer WD (2011) Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* **120**: 109-127
- Schwartz EK, Wright WD, Ehmsen KT, Evans JE, Stahlberg H, Heyer WD (2012) Mus81-Mms4 functions as a single heterodimer to cleave nicked intermediates in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* **32**: 3065-3080
- Segurado M, Tercero JA (2009) The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell* **101**: 617-627
- Shrivastav N, Li D, Essigmann JM (2010) Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* **31**: 59-70
- Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD (1996) Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* **86**: 811-822
- Smith S, Hwang JY, Banerjee S, Majeed A, Gupta A, Myung K (2004) Mutator genes for suppression of gross chromosomal rearrangements identified by a genome-wide screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9039-9044
- Stelter P, Ulrich HD (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**: 188-191
- Stoepker C, Hain K, Schuster B, Hilhorst-Hofstee Y, Rooimans MA, Steltenpool J, Oostra AB, Eirich K, Korthof ET, Nieuwint AWM, Jaspers NGJ, Bettecken T, Joenje H, Schindler D, Rouse J, de Winter JP (2011) SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat Genet* **43**: 138-141
- Strebhardt K, Ullrich A (2006) Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**: 321-330
- Sullivan M, Morgan DO (2007) Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 894-903
- Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 739-750
- Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, Harper JW (2009) Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* **138**: 63-77
- Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 630-670
- Szakai B, Brnzei D (2013) Premature Cdk1/Cdc5/Mus81 pathway activation induces aberrant replication and deleterious crossover. *EMBO J* **32**: 1155-1167

Tay YD, Wu L (2010) Overlapping roles for Yen1 and Mus81 in cellular Holliday junction processing. *J Biol Chem* **285**: 11427-11432

Taylor ER, McGowan CH (2008) Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3757-3762

Tercero JA, Diffley JF (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**: 553-557

Tercero JA, Longhese MP, Diffley JF (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11**: 1323-1336

Thomas BT, Rothstein R (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619-630

Thu HP, Nguyen TA, Munashingha PR, Kwon B, Dao Van Q, Seo YS (2015) A physiological significance of the functional interaction between Mus81 and Rad27 in homologous recombination repair. *Nucleic Acids Res* **43**: 1684-1699

Tomkinson AE, Bardwell AJ, Bardwell L, Tappe NJ, Friedberg EC (1993) Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. *Nature* **362**: 860-862

Trowbridge K, McKim K, Brill SJ, Sekelsky J (2007) Synthetic lethality of *Drosophila* in the absence of the MUS81 endonuclease and the DmBlm helicase is associated with elevated apoptosis. *Genetics* **176**: 1993-2001

Tsodikov OV, Enzlin JH, Scharer OD, Ellenberger T (2005) Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11236-11241

Tsutakawa SE, Classen S, Chapados BR, Arvai AS, Finger LD, Guenther G, Tomlinson CG, Thompson P, Sarker AH, Shen B, Cooper PKç, Grasby JA, Tainer JA (2011) Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily. *Cell* **145**: 198-211

Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**: 859-864

Vázquez MV (2012) "Análisis de factores implicados en la respuesta celular al daño en el DNA durante la replicación cromosómica en *Saccharomyces cerevisiae*". Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid

Vazquez MV, Rojas V, Tercero JA (2008) Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *DNA Repair (Amst)* **7**: 1693-1704

Ward JF (1990) The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int J Radiat Biol* **57**: 1141-1150

Wechsler T, Newman S, West SC (2011) Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature* **471**: 642-646

Westerveld A, Hoeijmakers JH, van Duin M, de Wit J, Odijk H, Pastink A, Wood RD, Bootsma D (1984) Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* **310**: 425-429

Whitby MC, Osman F, Dixon J (2003) Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *J Biol Chem* **278**: 6928-6935

Wu F, Shirahata A, Sakuraba K, Kitamura Y, Goto T, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, Hibi K (2010) Down-regulation of Mus81 as a potential marker for the malignancy of gastric cancer. *Anticancer Res* **30**: 5011-5014

- Wyatt HD, Laister RC, Martin SR, Arrowsmith CH, West SC (2017) The SMX DNA Repair Tri-nuclease. *Mol Cell* **65**: 848-860
- Wyatt HD, Sarbajna S, Matos J, West SC (2013) Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday junction resolution in human cells. *Mol Cell* **52**: 234-247
- Xiao W, Chow BL, Milo CN (1998) Mms4, a putative transcriptional (co)activator, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from endogenous and environmental DNA damage. *Mol Gen Genet* **257**: 614-623
- Xiao W, Derfler B, Chen J, Samson L (1991) Primary sequence and biological functions of a *Saccharomyces cerevisiae* O6-methylguanine/O4-methylthymine DNA repair methyltransferase gene. *EMBO J* **10**: 2179-2186
- Xie S, Zheng H, Wen X, Sun J, Wang Y, Gao X, Guo L, Lu R (2016) MUS81 is associated with cell proliferation and cisplatin sensitivity in serous ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **476**: 493-500
- Yazinski SA, Zou L (2016) Functions, Regulation, and Therapeutic Implications of the ATR Checkpoint Pathway. *Annu Rev Genet* **23**: 155-173
- Zhang C, Roberts TM, Yang J, Desai R, Brown GW (2006) Suppression of genomic instability by SLX5 and SLX8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **5**: 336-346